

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА імені О. М. БЕКЕТОВА

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для виконання лабораторних робіт
із навчальної дисципліни

«МІКРОБІОЛОГІЯ»

*(для студентів 4 курсу денної і заочної форм навчання
підготовки 6.060101 – Будівництво, професійне спрямування
«Водопостачання та водовідведення»*

Харків
ХНУМГ ім. О. М. Бекетова
2019

Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт із дисципліни «Мікробіологія» (для студентів 4 курсу денної і заочної форм навчання підготовки 6.060101 – Будівництво, професійне спрямування «Водопостачання та водовідведення») / Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова ; уклад. : І. М. Чуб. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2019. – 78 с.

Укладач: канд. техн. наук, доц. І. М. Чуб

Рецензент

Г. І. Благодарна, кандидат технічних наук, доцент Харківського національного університету міського господарства імені О. М. Бекетова

Рекомендовано кафедрою водопостачання, водовідведення та очистки вод, протокол № 1 від 27.08.2015 .

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ.....	5
Лабораторна робота № 1 Живильні середовища для вирощування мікроорганізмів.....	5
Лабораторна робота № 2 Морфологія та дослідження бактерій.....	13
Лабораторна робота № 3 Самоочищення водойм. Зони сапробності.....	22
Лабораторна робота № 4 Санітарно-мікробіологічні показники якості води.....	31
Лабораторна робота № 5 Індикаторні мікроорганізми.....	49
Лабораторна робота № 6 Біологічний аналіз активного мулу і біоплівки.....	59
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	70
ДОДАТКИ.....	71

ВСТУП

Мікробіологія води вивчає екологію мікроорганізмів, що живуть у воді, вплив різних токсикантів на мікроорганізми та гідробіоти, мікробіологічне забруднення водойм, морфологію та фізіологію всіх представників мікросвіту (бактерії, гриби, найпростіші, віруси). За своєю суттю мікробіологія води є фундаментальною наукою для фахівців у сфері очищення води.

Ці методичні рекомендації містять практичні засади курсу, що вивчає різноманітність мікроорганізмів, їх місце в еволюції, морфологію, основні фізіологічні та біохімічні властивості, а також допомагають самостійно виконувати завдання та відповідати на запитання під час поглибленого вивчення курсу.

Особлива увага приділяється питанням поширення мікроорганізмів у біосфері, їх ролі в колообігу речовин у природі, участі в процесах самоочищення природного середовища від техногенних факторів.

У кожному розділі наведені питання для самоконтролю, необхідні для самостійної роботи студентів під час вивчення теоретичного матеріалу курсу.

Крім набуття теоретичних знань із мікробіології майбутні фахівці з очищення природних і стічних вод мають брати участь у лабораторно-практичних заняттях. Отже, мета лабораторних занять – закріпити та поглибити знання теоретичного матеріалу, навчитися розпізнавати окремі групи й види мікроорганізмів, придбати необхідні вміння та навички щодо визначення за мікробіологічними показниками безпеки питної води й санітарно-гігієнічного стану очисних та інших споруд.

Кожна лабораторна робота методичних рекомендацій містить коротке обґрунтування мети роботи, опис техніки й методи проведення дослідів, аналізу отриманих результатів, а також перелік необхідних матеріалів і устаткування для проведення роботи. У кінці кожної роботи наведені контрольні питання для закріплення отриманих знань.

Під час підготовки до занять студенти повинні ретельно вивчити теоретичний матеріал відповідно до конспектів лекцій та літературних джерелами. Лабораторні роботи виконуються відповідно до методичних рекомендацій. Після кожного заняття передбачено захист виконаних студентами робіт.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Лабораторна робота № 1 ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи:

1. Ознайомитися з класифікацією поживних середовищ.
2. Ознайомитися з технікою приготування основних поживних середовищ (м'ясо-пептонний бульйон – МПБ, м'ясо-пептонний агар – МПА, сусло-агар СА).

1.1 Теоретичні відомості

1.1.1 Живильні середовища

Мікроорганізмам, як і всім іншим організмам, потрібен набір різних хімічних елементів. Деякі елементи (С, Н, Р, О, S, Са, Mg, К) потрібні у відносно великих кількостях, тому їх відносять до **макроелементів**, для інших елементів (Zn, Mn, З, No, В, Cu, I) – досить наявності слідів, тому їх називають **мікроелементами**. Крім цього, мікроорганізмам потрібні деякі готові органічні сполуки, які називають **факторами зростання**.

Виходячи з поживних потреб мікроорганізмів для їх вирощування в лабораторних умовах, створюють поживні (культурні) середовища, що містять набір органічних і мінеральних речовин, які забезпечують зростання й розвиток мікроорганізмів. Живильні середовища мають виняткове значення в мікробіології. Правильний підбір складу середовища забезпечує можливість виділення мікроорганізмів із місць їх житла, отримання чистих культур, вивчення їх біохімічних особливостей, сприяє швидкій та правильній діагностиці інфекційних хвороб, дає можливість отримувати біомасу корисних для народного господарства мікроорганізмів.

За походженням і складом живильні середовища можна розділити на натуральні (природні), синтетичні і напівсинтетичні.

Натуральні середовища бувають рослинного і тваринного походження. Вони містять у своєму складі всі інгредієнти, необхідні для росту та розвитку мікроорганізмів. Склад цих середовищ точно не визначений. Такими середовищами є відвари злаків, трав, овочеві і фруктові соки, картопля, морква, молоко, тваринні тканини, кров, сироватка, сеча, відвари м'яса, вода морська, озерна і мінеральних джерел, яйця птахів, їх зародки та інші. Прикладом натуральних середовищ, які найбільш часто використовують, є м'ясо-пептонний бульйон (МПБ).

Для цього готують м'ясний відвар. Із цією метою свіже м'ясо (яловичину, телятину або конину) звільняють від кісток, жиру, сухожиль, рубають і пропускають через м'ясорубку 500 г такого фаршу, кладуть у каструлю, заливають 1 л водопровідної води і залишають в прохолодному місці на 24 години або в термостаті за температури 30 °С на 6 годин, а за 37 °С – на 2 години для екстрагування різноманітних необхідних для харчування мікроорганізмів речовин. Потім м'ясо віджимають через марлю і отриманий настій кип'ятять протягом 30 хв для згортання білка, який відокремлюють фільтруванням. Після того, як настій охолоне, його фільтрують через складений паперовий фільтр, попередньо змочений водою (або крізь фільтрувальне полотно, яке накладають на скляну воронку). Вологий паперовий фільтр не дуже міцний, тому рідину на нього наливають обережно по стінці. Відфільтрований настій стерилізують. Стерильна м'ясна вода є основою для приготування м'ясо-пептонного бульйону. Для цього до 1 л м'ясної води додають 10 г пептону і 5 г NaCl. Після 10–15 хв кип'ятіння його охолоджують, встановлюють необхідне значення рН, фільтрують і стерилізують. Пептони додають замість згорнутого м'ясного білка. Вони є продуктом неповного руйнування білка, їх отримують кислотним або ферментативним гідролізом м'яса або молочного казеїну. Перевагою цих джерел амінокислот є те, що вони легше засвоюються і за стерилізації згортаються, тому стерильний бульйон залишається прозорим. Зростання мікроорганізмів у таких середовищах легше визначається за появи помутніння.

Для вирощування мікроорганізмів в якості поживного середовища широко використовується також нехмельное пивне сусло. Цей субстрат, також, як і м'ясна вода, містить велику кількість корисних речовин (амінокислот, нуклеїнових кислот, вітамінів, мінеральних солей). Для приготування сусла використовують пророщене ячмінне насіння (солод), в якому активізуються протеолітичні і амінолітичні ферменти.

Дріжджове середовище використовується для культивування багатьох гетеротрофів. Готується воно зі свіжих або пресованих дріжджів. Грунтова витяжка застосовується для виділення та культивування мікроорганізмів ґрунту.

Синтетичні середовища готують з певних хімічно чистих сполук зазначених концентрацій. У таких середовищах вивчають обмін речовин мікроорганізмів, тому що в них можна врахувати кількість і якість речовин, які надходять у клітини, зміни цих з'єднань під впливом мікроорганізмів, виявити метаболіти, які виділяються бактеріальними клітинами в процесі життєдіяльності. Перевага синтетичних середовищ полягає в їх здатності до відтворення. Залежно від потреби мікроорганізмів синтетичні середовища можуть бути дуже складного або дуже простого складу. Прикладом синтетичного середовища є середовище Чапека для вирощування цвілевих грибів.

Напівсинтетичні середовища мають складний склад. Компонентами цих середовищ (вуглеводи, фосфати, нітрати та інші) є натуральні продукти: м'ясний відвар, дріжджовий екстракт, пивне сусло. Такі середовища використовують для вирощування мікроорганізмів у лабораторних умовах і промисловості.

Середовища для одного і того ж мікроорганізму можуть бути різними залежно від завдань дослідження.

За призначенням середовища бувають:

Стандартні або середовища загального призначення. У них вирощують або накопичують біомасу багатьох мікроорганізмів – це МПА, МПБ, МТЖ та інші.

Спеціальні середовища, або середовища спеціального призначення. Призначені для виявлення тих чи інших біохімічних особливостей мікроорганізмів або для отримання їх культур, які мають особливі властивості.

Крім спеціальних середовищ виділяють *елективні (виборчі) і диференційно-діагностичні*.

Елективні середовища (від лат. *Elektys* – вибираю) підбираються таким чином, щоб забезпечити найбільш сприятливі умови для вирощування певних мікроорганізмів. До них можуть бути додані речовини, які вибірково пригнічують розвиток супутньої мікрофлори. При посіві на такі середовища досліджуваних матеріалів, які містять суміш різних мікроорганізмів, перш за все буде проявлятися зростання того виду, для якого це середовище буде вибіркоvim. Ці середовища використовують для виділення мікроорганізмів із місць їх природного проживання або для отримання накопичувальних культур. Прикладом може бути середовище Ешбі для азотофіксуючих бактерій.

Диференційно-діагностичні середовища використовують для визначення видової приналежності дослідних мікроорганізмів, враховуючи особливості обміну їх речовин. Склад цих середовищ дозволяє чітко виявити найбільш характерні властивості мікроорганізмів. До них належать середовища з молоком, кров'ю, желатином, на яких вивчаються протеолітичні і гемолітичні властивості мікроорганізмів. Наявність желатинази та інших протеолітичних ферментів визначають за розрідженням желатину, згорнутого яєчного або сироваткового білка. Прикладом таких середовищ є середовище Ендо, яке використовується для виділення і визначення бактерій кишкової палички. Вона відрізняється від інших представників мікрофлори кишечника тим, що утворює колонії червоного кольору з металевим блиском.

Середовища класифікуються за *консистенцією*. Використовуються рідинні, сухі сипучі і *щільні середовища*.

Рідинні середовища використовують для накопичення біомаси або метаболітів мікроорганізмів. Це сприяє оновленню культур, які довго

зберігаються, підтриманню і збереженню тих культур, які погано ростуть на щільних середовищах. На рідинних середовищах легше виявляються фізіолого-біохімічні особливості мікроорганізмів.

Сухі сипучі середовища використовуються переважно промисловою мікробіологією. Це розварене пшоно, висівки, кварцовий пісок, просочений живильним розчином.

Щільні середовища необхідні для виділення й опису культурних властивостей чистих культур мікроорганізмів, тому що на них можливо отримати зростання ізольованих окремих клітин; для зберігання культур, визначення низки їх властивостей (наприклад, антагоністичних відносин між мікроорганізмами). Щільні живильні середовища готують із рідинних із додаванням до них агар-агару, гелю, желатину.

Агар-агар (малайське желе) є найкращою желеутворювальною речовиною, яке отримують із водоростей. Це складний полісахарид, який утворює гель із температурою плавлення 36–100 °С і температурою застигання біля 40 °С. Тому на середовищах із агаром можна культивувати мікроорганізми за будь-якої температури. Крім того, агар-агар як живильний субстрат використовується тільки небагатьма мікроорганізмами. Щільні живильні середовища отримують додаванням до рідинним 1-2 % агар-агару. Таким чином із МПБ готують МПА. Для отримання більш щільного середовища іноді додають 3 % агар-агару.

Желатин – це речовина білкової природи, яку отримують із кісток і хрящів тварин під час їх виварювання. Желатин додають до середовища в кількості 10–12 %. Як ущільнювач використовується обмежено. Це пов'язано з тим, що він розріджується під дією протеолітичних ферментів. Крім того, утворений желатином гель плавиться за температури 23–25 °С і застигає за 20 °С, а більшість мікроорганізмів розвиваються за 30–37 °С. За такої температури середовище знаходиться в розплавленому стані. Тому желатин використовують переважно для виявлення протеолітичної активності мікроорганізмів, для отримання гігантських глибинних колоній дріжджів, при їх ідентифікації.

Промисловим способом виготовляються деякі середовища у вигляді **сухих порошків**. Перевага таких середовищ полягає в їх стандартності, стабільності, простоті приготування і зручності під час транспортування. Сухі поживні середовища є гігроскопічними порошками, які зберігаються в спеціальних флаконах. У лабораторії з порошків готують середовища відповідно до рецептури, зазначеної на етикетці. Найчастіше використовують сухі середовища **Ендо**, сухий поживний агар, рибний живильний агар та інші. Живильні середовища відразу після приготування стерилізують.

Зростання на щільних поживних середовищах

На поверхні щільних поживних середовищ мікроорганізми можуть рости у вигляді колонії, штриха або суцільного газону. Колонією називають ізольоване скупчення клітин одного виду, яке виросло в більшості випадків із однієї клітини. Залежно від того, де розвивалися клітини (на поверхні щільного поживного середовища, в товщі його або на дні посудини), розрізняють поверхневі, глибинні й донні колонії. Колонії, що виросли на поверхні середовища, відрізняються великою різноманітністю і є найбільш істотною особливістю росту мікроорганізмів на щільному субстраті. Під час їх опису враховують такі ознаки:

- *форму колонії* (рис. 1.1) – кругла (*а*), кругла з фестончатим краєм (*б*), кругла з валиком по краю (*в*), ризоїдна (*г, д*), з ризоїдним краєм (*е*), амебоподібна (*ж*), ниткоподібна (*з*), складчаста (*і*), неправильна (*к*), концентрична (*л*), складна (*м*);
- *розмір (діаметр) колонії* – вимірюють у мм, якщо розмір колонії не перевищує 1 мм, то її називають точковою;
- *поверхня колонії* – гладка, шорстка, борозниста, складчаста, зморшкувата, з концентричними колами або радіально покреслена;
- *профіль колонії* – плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний тощо (рис. 1.2);
- *блиск і прозорість* – колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора;
- *колір колонії* – безбарвна (брудно-білі колонії належать до безбарвних) або пігментована – біла, жовта, золотиста, помаранчева, бузкова, червона, чорна. Особливо відзначають виділення пігментів у субстрат. Під час опису колоній актиноміцетів відзначають пігментацію повітряного і субстратного міцелію, а також виділення пігментів у середовище;
- *край колонії* – рівний, хвилястий, зубчастий тощо (рис. 1.3);
- *структура колонії* – однорідна, струменева тощо (рис. 1.4).

Консистенцію колонії визначають, торкаючись до її поверхні петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути щільною, м'якою або вростають в агар, слизовою (прилипає до петлі), тягучою, плівковою (зніметься цілком), тендітною (легко ламається під час дотику петлею).

Глибинні колонії, навпаки, досить одноманітні. Найчастіше вони схожі на більш-менш сплющені чечевички, в проекції мають форму овалів із загостреними кінцями. Лише глибинні колонії небагатьох бактерій нагадують пучки вати з ниткоподібними виростами в живильне середовище. Утворення глибинних колоній часто супроводжується розривом щільного середовища, якщо колонії виділяють вуглекислоту або інші гази.

Донні колонії найрізноманітніших мікроорганізмів мають вигляд тонких прозорих плівок, що стеляться дном.

Розміри й деякі інші особливості колоній змінюються з віком і залежать від складу середовища, тому під час їх опису зазначають на вік культури, склад середовища і температуру культивування.

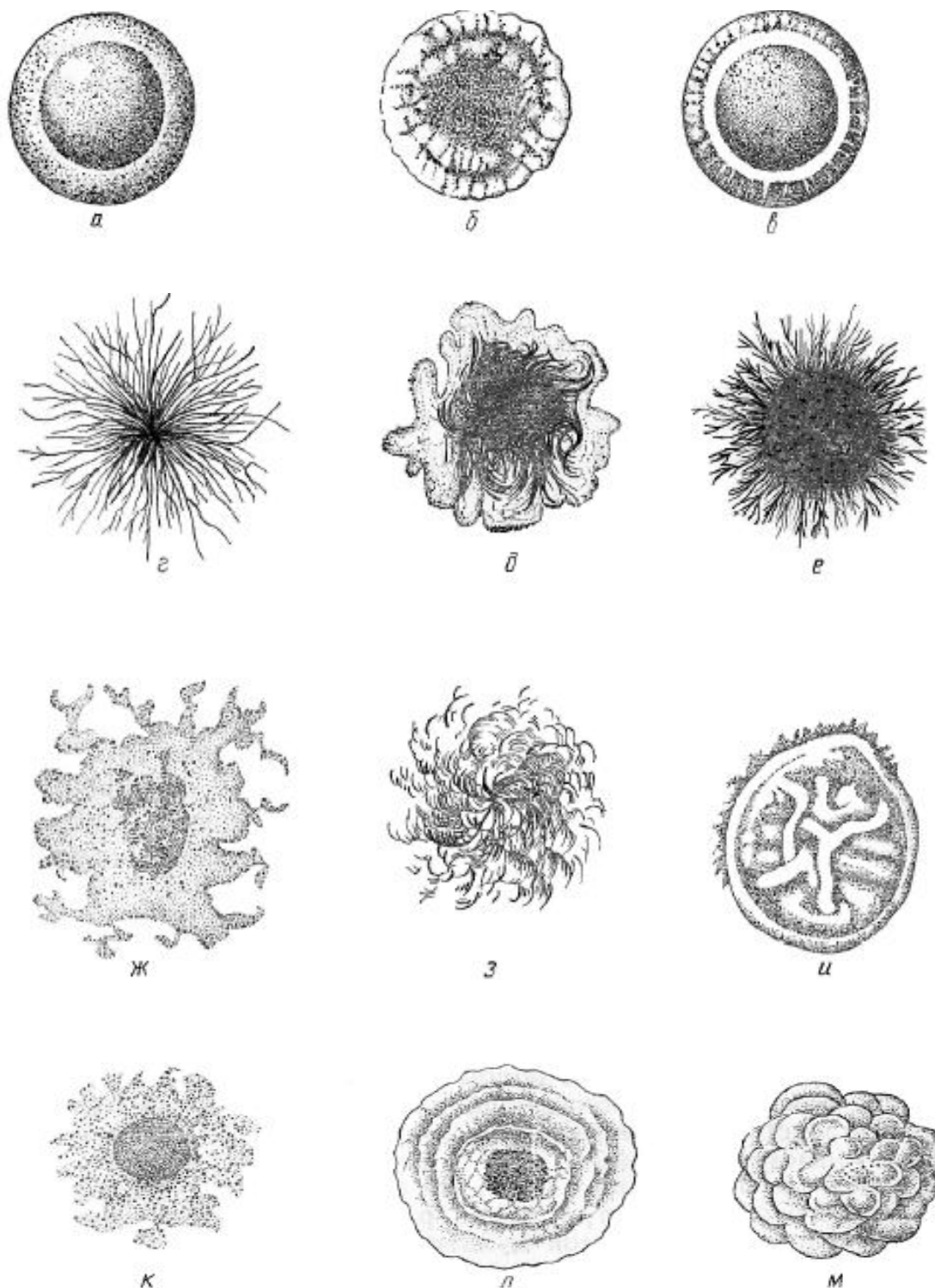


Рисунок 1.1 – Форма колонії

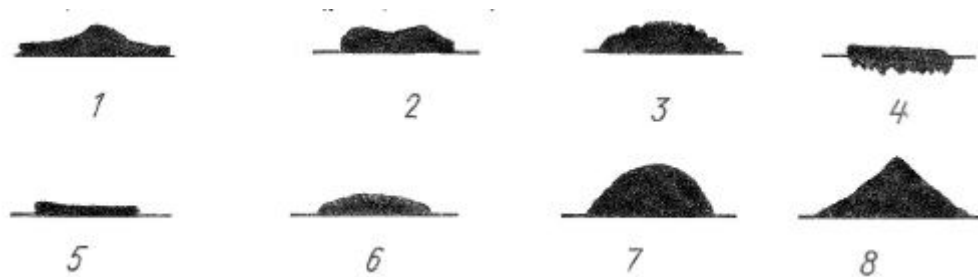


Рисунок 1.2 – Профіль колонії:

1 – вигнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбистий; 4 – вростає в агар;
5 – плоский; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний

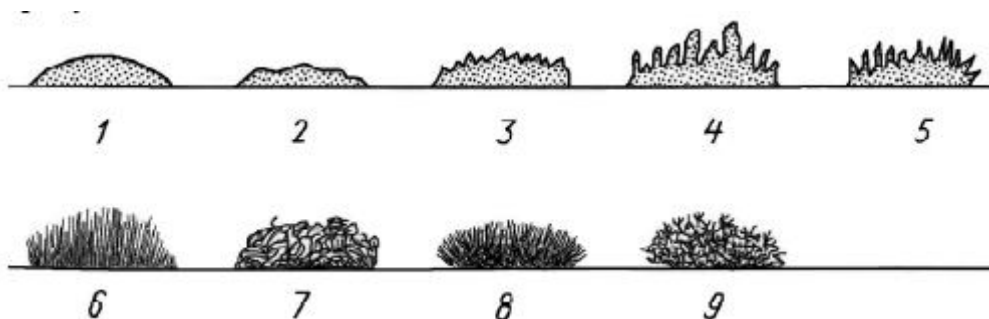


Рисунок 1.3 – Край колонії:

1 – гладкий; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий; 4 – лопатевий; 5 – неправильний;
6 – війчастий; 7 – нитчастий; 8 – ворсинчастий; 9 – гіллястий

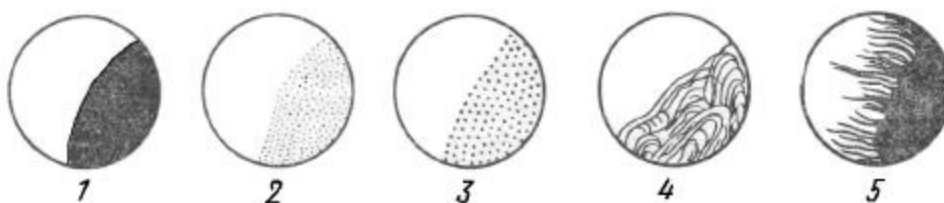


Рисунок 1.4 – Структура колонії:

1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – грубозерниста; 4 – струменева;
5 – волокниста

Зростання мікроорганізмів у рідких середовищах

Зростання мікроорганізмів у рідких середовищах більш одноманітне й супроводжується помутнінням середовища, утворенням плівки або осаду. Характеризуючи зростання в рідкому середовищі, відзначають ступінь помутніння – слабка, помірна або сильна; особливості плівки – тонка, щільна

або пухка, гладка або складчаста, а при утворенні осаду вказують – бідний або рясний, щільний, пухкий, слизовий або пластівчастий.

Нерідко зростання мікроорганізмів супроводжується появою запаху, пігментацією середовища, виділенням газу. Останнє виявляють за утворенням піни, бульбашок, а також за допомогою «поплавців» – маленьких запаяних із одного кінця трубочок. Поплавки поміщають у пробірку запаяним кінцем вгору перед стерилізацією середовища і стежать, щоб він повністю був заповнений середовищем. У разі виділення газу він накопичується в поплавці у вигляді бульбашки.

Для опису характеру зростання в рідких середовищах мікроорганізми вирощують на м'ясопептонному бульйоні або на іншому середовищі, що забезпечує добре зростання цього мікроорганізму. Найчастіше використовують 4–7-добові культури.

2.2 Експериментальна частина

Порядок виконання роботи

1. Розглянути колонії бактерій і грибів, відзначаючи розмір, форму, будову зовнішнього краю, характер поверхні, колір колонії, міцелію грибів та органи розмноження.

2. Після візуального огляду приступають до мікроскопічного вивчення грибів і бактерій. Для вивчення бактерій використовують препарат «фіксованих клітин», грибів – препарат «роздавлена крапля» (Л/р № 2). Слід пам'ятати, що вегетативний міцелій більшості видів грибів незабарвлений. Пігментований тільки плодоносний міцелій. Тому молоді колонії – білі або сіруваті. По мірі розвитку органів плодоношення колонії набувають забарвлення. Для приготування препарату «роздавлена крапля» відбирають невеликий шматочок міцелію разом із плодоносними гіфами у краю колонії, на кордоні з пігментованою та непофарбованою частинами колонії.

3. Мікроскопувати препарат грибів спочатку з об'єктивом 8 х, потім 40 х, препарат бактерій – з іммерсійним об'єктивом 90 х.

4. Під час мікроскопування необхідно визначити: у грибів – будову міцелію і плодоносних гіф, форму і будову спор (конідій); у бактерій – форму, наявність спор.

5. Зарисувати зображення грибів і бактерій.

Контрольні питання

1. Які умови необхідно створити для вирощування мікроорганізмів?
2. Яким загальним вимогам повинне відповідати будь-яке живильне середовище?
3. Як класифікуються живильні середовища?

4. Охарактеризуйте природні і штучні живильні середовища.
5. Що таке елективні та диференційно-діагностичні середовища?
6. Дати класифікацію живильних середовищ за консистенцією
7. Які стандартні середовища використовують для вирощування бактерій, дріжджів і цвілевих грибів?
8. Як готують щільні середовища?
9. Чим відрізняються желатин і агар?
10. Яка температура плавлення і затвердіння середовищ із агаром і желатином?
11. Якої форми бувають колонії?
12. Які колонії називають точковими?
13. Як визначають консистенцію колонії?
14. Чим супроводжується зростання мікроорганізмів у рідких середовищах?
15. Як можна виявити виділення газу мікроорганізмами?

Лабораторна робота № 2 МОРФОЛОГІЯ БАКТЕРІЙ. ДОСЛІДЖЕННЯ НАЙБІЛЬШ ПОШИРЕНИХ У ПРИРОДІ БАКТЕРІЙ

Мета роботи: Ознайомитися з будовою бактерій, методами фарбування. Ознайомитися з найбільш поширеними у природі бактеріями.

2.1 Морфологія бактерій. Виготовлення фіксованих забарвлених мікробіологічних препаратів

2.1.1 Теоретичні відомості

Форми прокаріот. Три основні форми бактеріальної клітини – кулясту, паличкоподібну та звивисту – описав у XVII столітті Антоній Ван Левенгук. На сьогодні відомі такі форми бактеріальної клітини: кулясті (коки) розподіляються на мікрококи (після розподілу розходяться, агрегацій не утворюють), диплококи (з'єднані попарно), тетракоки (з'єднані по 4), стрептококи (утворюють ланцюжки різної довжини), стафілококи (утворюють агрегації у вигляді виноградного грона) та сарцини (утворюють пакети з 8–16–32 клітин); паличкоподібні (циліндричні) – довжина клітини в кілька разів перевищує ширину, можуть мати загострену, закруглену, зрізану форму закінчень клітини, розподіляються на бактерії (не утворюють спор) і бацили (утворюють ендоспори), які можуть з'єднуватися попарно (диплобактерії, диплобацили) або утворювати ланцюжки різної довжини (стрептобактерії, стрептобацили); звивисті розподіляються на вібріони (мають вигляд коми), спірили (клітини мають 1–6 завитків), спірохети

(мають більше 6 завитків); а також бактерії, які мають незвичайну форму клітини: тороїдні (форма зімкнутого або розімкнутого кільця); простекобактерії (мають вирости клітини); зіркоподібні, трикутні, квадратні. Також до незвичайних форм бактеріальних клітин можна віднести стебельцеві бактерії (рід *Caulobacter*), або бактероїди групи *Rhizobium* – V-, Y-подібна форма клітини однієї зі стадій розвитку.

Виготовлення мікробіологічного препарату

Під час виконання лабораторних робіт необхідно дотримуватися певних правил техніки безпеки при роботі з живими культурами мікроорганізмів, а саме:

- відкривати та закривати пробірку з мікроорганізмами необхідно виключно у полум'ї пальника;
- під час виготовлення препарату пробку необхідно затиснути водночас мізинним і безіменним пальцями, а не затискати пробку між ними;
- відкриту пробірку з мікроорганізмами необхідно тримати за полум'ям пальника, нахилену під невеликим кутом, отвором униз;
- під час виготовлення препарату предметне скло тримати виключно за грані;
- скло з незафіксованими мікроорганізмами повинно знаходитися виключно за полум'ям пальника;
- залишки культури мікроорганізмів на бактеріальній петлі після виготовлення мазка спалити у полум'ї пальника та ретельно простерилізувати усю петлю;
- не тримати на робочому столі сторонніх предметів;
- після закінчення роботи ваткою, змоченою 70 % етиловим спиртом, протерти поверхню стола та вимити руки з милом.

Для вивчення форми прокаріотної клітини найчастіше використовують метод фіксованих забарвлених препаратів. Виготовлення мікробіологічного препарату цим методом включає ряд послідовних операцій.

1. Виготовлення мазка. На чисте знежирене предметне скло нанести невелику краплю дистильованої води, в неї за допомогою стерильної бактеріальної петлі внести невелику кількість маси мікроорганізмів і розподілити по поверхні скла. Мазок повинен бути тонким, діаметром близько 1 см. Якщо культура мікроорганізмів вирощувалася на рідкому живильному середовищі, за допомогою стерильної піпетки на чисте знежирене предметне скло наносять невелику краплю культуральної рідини, яка містить мікроорганізми. Краплю, яка містить мікроорганізми, можна розподілити по склу за допомогою стерильної бактеріальної петлі, або розподілити за допомогою грані іншого предметного (покривного) скла.

2. Висушування мазка. Проводять без нагрівання, за кімнатної температури до повного випаровування води з поверхні предметного скла.

3. Фіксація мазка. Проводиться з метою: а) вбити мікроорганізми, щоб зробити безпечною подальшу роботу з ними; б) прикріпити мазок до

поверхні скла, щоб він не змився при подальших маніпуляціях; в) зруйнувати поверхневі структури клітини для полегшення проникнення барвників, що покращує забарвлення клітин. Зазвичай мазок фіксують у полум'ї пальника, при цьому скло тримають за грані, мазком угору і 3-4 рази проносять крізь полум'я. Для дослідження внутріклітинних структур мікроорганізмів використовують більш м'яку фіксацію – етиловим спиртом (96 %), сумішшю етилового спирту й ефіру, ацетоном тощо.

4. Забарвлення мазка. Може бути простим (використовується один барвник) і диференціальним (використовується кілька барвників у певній послідовності). На охолоджений після фіксування мазок піпеткою наносять кілька крапель барвника (мазок повинен бути повністю вкритий шаром барвника), при цьому піпетка не повинна торкатися поверхні скла. Для кожного барвника існує свій час контакту з поверхнею зафіксованих клітин. У разі диференціального забарвлення барвники витримують на мазку вказаний у методиці час і змивають водою або певним розчином.

5. Промивання препарату. Проводять дистильованою водою до «чистої води», тобто з поверхні скла повинна стікати прозора вода, скло при цьому тримають під кутом, і струм води направляють безпосередньо на мазок. Барвник, який не поглинувся клітинами, змивається.

6. Висушування препарату. Промите скло ретельно витирають із нижнього боку клаптиками фільтрувального паперу, а з іншого боку обережно промокають воду із залишками барвника та висушують на повітрі або над полум'ям пальника. У разі неякісного висушування скла погіршується якість зображення під мікроскопом.

2.1.2 Дослідження морфології бактерій на прикладі *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* і *Sarcina flava*

Хід роботи.

1. Виготовити мазок культури *Bacillus subtilis* (сінна паличка), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником метиленовий синій (час контакту з клітинами – 3–5 хв), промити водою та висушити.

2. Виготовити мазок культури *Staphylococcus aureus* (стафілокок золотистий) або *Sarcina flava* (сарцина жовта), висушити, зафіксувати у полум'ї пальника та забарвити простим способом барвником фуксин (час контакту з клітинами – 1–2 хв), промити водою та висушити.

3. На обидва препарати нанести імерсійне масло та роздивитися за допомогою імерсійної системи мікроскопа.

4. Зробити схематичні рисунки досліджених мікроорганізмів.

2.1.3 Експериментальна частина

Прокаріотні мікроорганізми можна поділити на дві групи – **грампозитивні** та **грамнегативні**. Така назва з'явилася після запропонованого у 1884 датським вченим Г. Грамом диференціального методу забарвлення бактерій, за яким одні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір (грампозитивні), а інші у червоний або рожевий колір (грамнегативні). Сутність цього методу полягає в тому, що комплекс генціанового фіолетового барвника (генціан-віолет) з йодом після обробки мазка спиртом утримується клітинними покривами одних бактерій і вимивається з покривів інших, тому для їх визначення необхідно використовувати додатковий барвник, і для полегшення диференціювання обирають контрастний – червоний. Здатність забарвлюватися або не забарвлюватися у синє-фіолетовий колір відображає фізичні властивості клітинної стінки мікроорганізмів. Донедавна розглядалися різні теорії, що пояснюють диференційне забарвлення бактерій за Грамом (наприклад, хімічна, мембранна, ізоелектрична). Згідно з сучасними уявленнями, після проникнення у клітини розчинна хлорна форма генціан-віолету переходить у нерозчинну йодну форму і випадає у осад, при цьому забарвлюється цитоплазма клітини. За обробки препарату розчинником (етиловий спирт, ацетон) із цитоплазматичної мембрани екстрагуються ліпіди, це призводить до підвищення її пористості. Таким чином, мембрана не є перешкодою для вимивання комплексу генціан-віолет-йод. Але зазвичай клітина має муреїновий шар (різної товщини та пористості у різних бактерій), який характеризується високою стійкістю до органічних розчинників. Багатошаровий малопористий муреїновий шар перешкоджає вимиванню барвника – клітини забарвлюються у синє-фіолетовий колір (грампозитивно), а за наявності моношару муреїну із крупними порами клітини забарвлюються за Грамом негативно. Слід зауважити, що характер забарвлення прокаріот за Грамом залежить від віку культури, факторів зовнішнього середовища тощо.

2.1.4 Диференціальний спосіб забарвлення бактерій за Грамом (класичний)

Класичний спосіб забарвлення, запропонований Грамом, був дороблений і модифікований багатьма вченими, існує навіть експрес-метод визначення **грампозитивності** і **грамнегативності** (жива культура грамнегативних бактерій утворює слиз при обробці 3 % КОН протягом 5–10 секунд).

Хід роботи.

1. На одному предметному склі по черзі приготувати мазки *Escherichia coli* (кишкова паличка) та *Bacillus mesentericus* (картопляна паличка).

2. На зафіксовані у полум'ї пальника мазки покласти невеликі клаптики фільтрувального паперу та нанести на нього генціановий фіолетовий барвник так, щоб папір повністю був зволожений барвником. У разі нещільного прилягання паперу до скла легко натиснути на папір бактеріальною петлею.

3. Через 5–7 хв пофарбований папір зняти та забарвити препарати розчином Люголю 1 хв, при цьому препарати потемніють.

4. Розчин Люголю злити й обробити препарати 96 % етиловим спиртом 30–60 с (нанести кілька крапель спирту, зачекати 10–15 с, злити, процедуру повторити 2–3 рази, залежно від товщини мазків та інтенсивності попереднього фарбування).

5. Препарати промити до «чистої води».

6. Дофарбувати препарати фуксином протягом 1–2 хв.

7. Барвник змити водою, препарати висушити та мікроскопіювати з імерсійним маслом.

8. Визначити, яка із запропонованих культур є грампозитивною, а яка – грамнегативною, якщо відомо, що *Bacillus mesentericus* – спороутворювальна бактерія, тому у полі зору будуть спостерігатися слабозабарвлені овальні тільця – спори, також бактерія утворює довгі ланцюги клітин. Кишкова паличка спор не утворює, зрідка можуть траплятися короткі ланцюжки по 2–3 клітини.

9. Зробити схематичні малюнки досліджених мікроорганізмів.

2.1.4 Фарбування ядерних елементів методом Романовського-Гімза

Як відомо, головна відміна прокаріотних організмів від еукаріотів – відсутність оформленого ядра, але генетичний матеріал обох груп представлений ДНК. Структура, яка у прокаріот виконує функцію носія генетичної інформації, отримала назву нуклеоїда та зазвичай складається із замкненої в кільце молекули ДНК (бактеріальна хромосома), хоча інколи трапляються лінійні хромосоми. Бактеріальна хромосома компактно упакована, в ній можна виділити як суперспіралізовані, так і деспіралізовані ділянки ДНК; стабільність такої упаковки підтримується білками та молекулами РНК. В одній бактеріальній клітині може налічуватися до 9 копій хромосоми, але нуклеоїд в клітині один. Окрім нуклеоїда в клітинах прокаріот можна спостерігати необов'язкові структури, бактеріальні плазмідні – невеликі, замкнені в кільце ділянки ДНК. Плазміди, не зв'язані з нуклеоїдом, несуть інформацію про додаткові властивості організму та під час ділення бактерій передаються до однієї з дочірніх клітин.

Оскільки прокаріотні клітини мають достатньо малі розміри, для полегшення процедури мікроскопіювання генетичного матеріалу, рекомендується забарвлювати ядерний матеріал еукаріотного мікроорганізму наприклад, дріжджів.

Хід роботи

1. Виготовити мазок *Saccharomyces cerevisiae* та висушити за кімнатної температури.
2. Зафіксувати мазок у рідині Карнуа протягом 15 хв.
3. На висушений фіксований мазок нанести барвник Романовського-Гімза та витримати 40–45 хв у термостаті за температури 37 °С.
4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопувати з імерсійним маслом.
5. Знайти в полі зору овальні клітини, в яких цитоплазма забарвлена у рожевий колір, а ядерний матеріал – у фіолетовий.
6. Зробити схематичний рисунок із позначенням ядерного матеріалу.

2.2.1 Дослідження найбільш поширених у природі бактерій

Теоретичні відомості

Молочнокислі бактерії – фізіологічна група хемоорганогетеротрофних, неспроутворювальних, нерухомих, факультативно анаеробних мікроорганізмів, збудників молочнокислого бродіння. Трапляються у молоці та кисломолочних продуктах, у соліннях, маринадах, у ґрунті, у філосфері та ризосфері рослин, у кишківнику хребетних. У результаті зброджування цукрів (глюкоза, фруктоза, маноза, сахароза, лактоза, мальтоза та ін.) утворюють молочну кислоту (гомоферментативне бродіння) або молочну, оцтову кислоти, етанол, CO₂ (гетероферментативне бродіння).

Оцтовокислі бактерії. До оцтовокислих бактерій належать два роди хемоорганогетеротрофних, неспроутворювальних, зазвичай рухомих, облігатно аеробних мікроорганізмів, які отримують енергію завдяки окисненню первинних спиртів до карбонових кислот, зокрема, етанолу – до оцтової кислоти, а вторинних спиртів – до кетонів. Представники оцтовокислих бактерій – роди *Gluconobacter* (здатні окиснювати етиловий спирт до оцтової кислоти, недоокиснювачі) і *Acetobacter* (швидко окиснюють етанол до оцтової кислоти, а потім кислоту повільно окиснюють далі, з виділенням CO₂, переокиснювачі). У природі трапляються на поверхні стиглих ягід або у повітрі, виступають забрудниками бродильних рідин.

Целюлозоруйнівні мікроорганізми. Мікробіологічний словник: целюлозоруйнівні мікроорганізми, аеробне й анаеробне розщеплення целюлози, целюлосоми, середовище Гетчинсона.

Як відомо, на поверхні ґрунту та в його верхніх шарах міститься значна кількість рослинних залишків, а основним компонентом клітинних стінок рослин є целюлоза. Целюлоза виступає енергетичним і конструктивним матеріалом для чисельної групи мікроорганізмів – бактерій (клостридії, міксобактерії), актинобактерій, мікроскопічних грибів. Об'єднувальною ознакою є здатність до ферментативного розщеплення целюлози, яке мікроорганізми здатні виконувати як в аеробних, так і в анаеробних умовах.

У присутності кисню целюлоза окиснюється до CO_2 та H_2O , і цей процес протікає за участі одного організму. На відміну від аеробного окиснення, в анаеробних умовах целюлоза окиснюється до CO_2 та CH_4 , і до таких реакцій здатні синтрофні мікробні угруповання. Розщеплення целюлози каталізує комплекс ферментів, які можуть виділятися в оточуюче середовище (екзоферменти) або бути пов'язаними з бактеріальною клітиною і знаходитися всередині целюлосом (ендоферменти). Целюлосоми – спеціальні утворення на поверхні бактеріальної клітини та складаються з поліпептидних субодиноць (целюлозні ферменти) і вуглеводних фібрил.

Біологічна фіксація азоту й азотфіксатори. Біологічна фіксація азоту – процес зв'язування молекулярного азоту повітря азотфіксувальними мікроорганізмами та переведення його у форму, досяжну для інших організмів, у першу чергу для вищих рослин. Фіксація азоту відбувається за участю ферментного комплексу – нітрогенази, який каталізує відновлення N_2 до NH_3 , при цьому джерелом енергії виступає АТФ. Азотфіксувальні мікроорганізми – систематично гетерогенна група, до якої входять азотфіксатори, що вільно мешкають – спороутворювальні палички (*Bacillus*, *Clostridium*), метилотрофні бактерії (*Methylobacter*, *Methylococcus*), тіонові та сіркобактерії (*Thiobacillus*, *Beggiatoa*), деякі зелені та пурпурні бактерії, більшість ціанобактерій, археї (*Methanobolus*, *Methanosarcina*); симбіотичні (бульбочкові) бактерії групи *Rhizobium*, а також асоціативні азотфіксатори – види родів *Azospirillum*, *Beijerinckia*, що мешкають на поверхні коренів вищих рослин.

2.2.2 Експериментальна частина

Дослідження молочнокислих бактерій

Хід роботи

1. На предметне скло нанести краплю кисломолочного продукту або розсолу, додати краплю дистильованої води та за допомогою бактеріальної петлі виготовити мазок.
2. Мазок висушити над полум'ям пальника та зафіксувати сумішшю Никифорова – кілька разів суміш нанести на мазок і злити.
3. На фіксований таким чином мазок нанести кілька крапель метиленового синього на 3–5 хв.
4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.
5. Знайти в полі зору ланцюжки коків або паличок. Зробити схематичний рисунок.

Дослідження оцтовокислих бактерій

Хід роботи

1. На предметне скло нанести краплю води, в неї за допомогою бактеріальної петлі перенести шматочок плівки з накопичувальної культури бактерій і зробити мазок.
2. Додати розчин Люголю, накрити покривним склом і через 10 хв мікроскопіювати з імерсійним маслом.
3. Знайти в полі зору забарвлені в жовтий або синій колір поодинокі палички, ланцюжки та зробити схематичний малюнок.

Дослідження целюлозоруйнівних мікроорганізмів з отриманням накопичувальної культури

В аеробних умовах розщеплювати целюлозу здатні як еукаріотні мікроорганізми (мікроскопічні гриби родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Botrytis* та ін.), так і прокаріоти. Це актинобактерії родів *Streptomyces*, *Micromonospora* та бактерії – *Cytophaga* (довгі палички, злегка зігнуті, з загостреними кінцями), *Cellvibrio* (рухомі короткі, злегка зігнені палички), *Cellfalcicula* (короткі товсті палички з загостреними кінцями) та ін.

Хід роботи.

1. У стерильні конічні колби ємністю 100–200 мл налити 50–100 мл простерилізованого рідкого середовища Гетчинсона.
2. У колбу внести 0.5–1 г ґрунту та на кінчику скальпеля – крейдяного порошку.
3. Із круглого листка фільтрувального паперу скласти складчастий конус і опустити на дно колби широкою стороною донизу.
4. Колбу закрити ватно-марлевою пробкою та поставити у термостат за температури 25-26 °C на 14 діб.

Через 14 діб уважно роздивитися колбу з накопичувальною культурою целюлозоруйнівних мікроорганізмів. Найбільш інтенсивно розщеплення фільтрувального паперу відбувалося на межі папір-рідина, де достатньо поживних речовин і кисню для розвитку аеробних мікроорганізмів. У результаті діяльності целюлозоруйнівних мікроорганізмів папір розпадається на окремі волокна, і конус осідає на дно, на самому папері неозброєним оком можна спостерігати слизисті плями жовтуватого або рожевого кольору – результат розвитку мікроорганізмів.

Хід роботи.

1. За допомогою бактеріальної петлі взяти невелику кількість слизу або шматочок напіврозщепленого паперу та розмазати по предметному склу без додавання води.
2. Виготовлений таким чином мазок висушити та зафіксувати в полум'ї пальника.
3. Зафіксований препарат фарбувати барвником фуксин протягом 3-4 хвилин.

4. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсійним маслом.

5. Знайти в полі зору целюлозоруйнівні мікроорганізми різної морфології. Зробити схематичні малюнки.

Дослідження асоціативних азотфіксаторів і тих, що вільно мешкають

Представники групи азотобактерій (азотфіксатори, що вільно мешкають) – грамнегативні, хемоорганогетеротрофні, аеробні бактерії. Найбільш поширеними є види родів *Azotobacter* і *Azomonas*. Вони мають клітини паличковидної або овальної форми, в основному рухомі – перитрихи, монотрихи. Деякі представники азотобактерій здатні синтезувати полісахаридну капсулу, тому на твердих поживних середовищах формують слизисті колонії. Бактерії роду *Azotobacter* можуть утворювати цисти (форми спокою) – структури, що виникають за рахунок появи додаткових слизистих шарів навкруги клітин, і таким чином клітини стають стійкими до висушування. Трапляються азотобактерії переважно у нейтральних і лужних ґрунтах, а також у водоймах.

Серед асоціативних азотфіксаторів найбільш поширеними вважаються представники роду *Azospirillum* – потовщені вібріони або прямі короткі палички, часто з загостреними кінцями, переважно рухомі, завдяки полярному джгутику, грамнегативні або грамваріабельні, аероби.

Бульбочкові бактерії – представники групи *Rhizobium*, здатні проникати в клітини кореня вищих рослин і викликати розростання тканин останнього, при цьому формується бульбочка, всередині якої і розвиваються бактерії. У результаті симбіотичних відносин бактерії отримують поживні речовини, а рослина – азот у доступній формі (у вигляді амінокислот). Ризобії мають форму палички, рухомі, не утворюють спор, облігатні аероби, нездатні фіксувати азот поза межами бульбочки. Коренева бульбочка утворюється кореневими клітинами, поживні речовини доставляються бактеріям транспортною системою, сформованою судинами рослини, а всередині бульбочки розвиваються клітини ризобіїв, при цьому вони змінюють форму – стають V-, Y-подібними, перетворюючись на бактероїди. Бульбочкові бактерії виключно видоспецифічні, тобто здатні утворювати симбіоз з певним видом бобових рослин.

Хід роботи.

1. Виготовити мазок культури бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium* sp., висушити за кімнатної температури та зафіксувати в полум'ї пальника.

2. Мазок забарвити метиленовим синім протягом 2-3 хвилин.

3. Препарат промити водою, висушити фільтрувальним папером і мікроскопіювати з імерсією.

4. Знайти в полі зору тонкі паличкоподібні клітини синьо-блакитного кольору.

5. Зробити схематичний рисунок.

Лабораторна робота № 3 САМООЧИЩЕННЯ ВОДОЙМ. ЗОНИ САПРОБНОСТІ

Мета роботи: вивчити процеси самоочищення водойм, познайомитися з методикою біотестування водойм, виявити комплекси інфузорій, що визначають ступінь сапробності водойми.

3.1 Теоретичні відомості

Біологічний метод оцінювання ступеня забруднення природних вод був розроблений у 1902 р. німецькими дослідниками Кольквітцем (ботанік) і Марссоном (зоолог).

У них були попередники, які відзначали належність певних організмів до забруднених вод, але чітку систему запропонували саме ці два автори, які провели величезну попередню роботу. Вони досліджували понад 800 різних водойм: від чистих високогірних озер до стічних колекторів – і поділили їх на три категорії або ступеня відповідно до процесів, що відбуваються у водоймі під час природного самоочищення.

1. Сильно забруднені води з різким переважанням відновних процесів – *полісапробна зона* (гр. *poly* багато, *sapros* гнилий).

2. Води, в яких відновлювальні процеси припинилися і почалися окиснювальні, з поступовим переважанням останніх – *мезосапробна зона* (гр. *mesos* середній).

3. Води, в яких спостерігається повне окиснення органічної речовини – *олігосапробна зона* (гр. *oligos* незначний).

Пізніше мезосапробну зону розділили на дві:

- *α-мезосапробна*, більш забруднена, близька до полісапробної,
- *β-мезосапробна*, що наближається до олігосапробної.

Потім була виділена ще катаробна зона (гр. *katharos* чистий), під якою малася на увазі абсолютно чиста вода, що не містить органічних речовин.

Таким чином, була створена система з 5 зон або ступенів сапробності, що характеризує поступовий процес самоочищення від крайнього ступеня забруднення до чистої води.

У кожній із зон сапробності розвивається властивий їй комплекс тваринних і рослинних організмів, здатних існувати в зазначених умовах, які і були названі авторами цієї системи *сапробними організмами* або *сапробіонтами*.

Таким чином, за складом і кількістю сапробіонтів можна встановити ступінь забруднення тієї ділянки водойми, на якій вони живуть.

Кольквітц і Марссон на підставі своїх досліджень склали списки показових організмів для кожної із зон сапробності, виділивши близько 1 000 *організмів-індикаторів*. Вони ж одночасно є і активними агентами самоочищення вод.

Ця система є екологічною, оскільки розглядає флору і фауну водойм в тісному зв'язку з умовами навколишнього середовища.

Забруднення, що надходять у водойму, в результаті здатності водойм до самоочищення поступово розбавляються й руйнуються. Деструкція забруднень протікає поступово і внаслідок цього поступово відновлюються умови, які були у водоймі до надходження стічних вод. Процес цей досить тривалий, і зона забруднення в річці може охоплювати десятки і сотні кілометрів. Розмір зони залежить від співвідношення обсягу стічних і річкових вод, концентрації та якості забруднюючих речовин, швидкості течії та інших причин.

Залежно від ступеня забруднення водойми та самоочищення водойми і їхні окремі ділянки поділяються на зони (табл. 3.1).

У разі забруднення водойми змінюються фізико-хімічні умови. При цьому одні форми гідробіонтів гинуть, інші отримують переваги для вільного розвитку, і в результаті відбувається зміна біоценозу на забрудненій ділянці. Багато гідробіонтів здатні розвиватися лише у воді певної якості, і тому виявляють чітко виражену пристосованість до певних зон забруднення.

Полісапробна зона (р) характеризується великим вмістом нестійких органічних речовин і наявністю продуктів їх анаеробного розпаду. У воді присутня достатня кількість білкових речовин. БСК (біологічне споживання кисню) становить десятки міліграмів на літр. Фотосинтез відсутній. Кисень може надходити у воду тільки за рахунок атмосферної реаерації, і оскільки він повністю витрачається на окиснення в поверхневих шарах, то у воді практично не виявляється. Вода містить метан і сірководень.

Для цієї зони характерна наявність великої кількості сапрофітної мікрофлори, представленої сотнями тисяч і навіть мільйонами клітин в 1 мл. У донних відкладеннях кисень відсутній, міститься багато органічного детриту, протікають відновні процеси, залізо знаходиться у формі FeS. Мул має чорне забарвлення, запах сірководню. У цій зоні масово розвиваються рослинні організми з гетеротрофним типом харчування: сапрофітні, нитчасті бактерії, сірчані бактерії, з найпростіших – інфузорії, безбарвні джгутикові (рис. 3.1).

Альфа-мезосапробна зона (α – m). У цій зоні починається аеробний розпад органічних речовин із утворенням аміаку, міститься багато вільної вуглекислоти, кисень присутній у малих кількостях. Метан і сірководень відсутні. Кількість забруднення, що визначається за БПК, все ще дуже велика: десятки міліграмів на літр. Кількість сапрофітних бактерій становить десятки й сотні тисяч на 1 мл.

Таблиця 3.1 – Рівні сапробності і трофності вод

Рівень сапробності	Ступінь трофності	Провідні організми із числа інфузорій
Полісапробна: дуже сильне органічне забруднення, мало кисню, багато бактерій; видовий склад бідний, чисельність особин висока	Політрофна: дуже великий надлишок поживних речовин (води, що гниють)	<i>Caenomorpha</i> , <i>Colpidium</i> , <i>Epalxella</i> , <i>Lacrymaria</i> , <i>Metopus</i> , <i>Vorticella</i>
α-мезосапробні: значне органічне забруднення, мало кисню, видовий склад багатий, чисельність особин висока	Евтрофна: багато поживних речовин, багато фотосинтезуючих протистів	<i>Carchesium</i> , <i>Chilodonella</i> , <i>Paramecium</i> , <i>Urocentrum</i>
β-мезосапробні: слабке органічне забруднення, багато кисню; видовий склад багатий		<i>Euplotes</i> , <i>Halteria</i> , <i>Spirostomum</i> , <i>Stentor</i>
Олігосапробна: чиста, багата киснем вода; видовий склад бідний, чисельність особин низька	Оліготрофна: мало поживних речовин	<i>Dileptus</i> , <i>Strobilidium</i> , <i>Thuricola</i>

У воді і донних відкладеннях відбуваються окиснювально-відновні процеси; залізо тривалентне і двовалентне, мул сіруватого забарвлення. В $\alpha - m$ зоні розвиваються організми, що витривалі до нестачі кисню й великого вмісту вуглекислоти. Переважають рослинні організми з гетеротрофним і міксотрофним харчуванням. Окремі організми мають масовий розвиток. Рясно розвиваються нитчасті бактерії, гриби, водорості. Із тваринних організмів рясні обростання сидячими інфузоріями (*Carchesium*), зустрічаються коловертки, багато забарвлених і безбарвних джгутикових (рис 3.2).

Бета-мезосапробна зона ($\beta - m$) відзначається в водоймах, майже звільнених від нестійких органічних речовин, розпад яких дійшов до утворення окиснених продуктів (повна мінералізація).

Кількість сапрофітних бактерій становить тисячі клітин на 1 мл і різко збільшується в період відмирання водної рослинності. Концентрація кисню й вуглекислоти сильно коливається протягом доби, в денні години вміст кисню у воді доходить до пересичення, і вуглекислота може повністю зникати. У нічні години спостерігається дефіцит кисню.

У мулі багато органічного детриту, інтенсивно протікають окиснювальні процеси, мул жовтого забарвлення.

У цій зоні велика різноманітність тварин і рослинних організмів. Масово розвиваються рослинні організми з автотрофним харчуванням, спостерігається цвітіння води багатьма представниками фітопланктону. У обростаннях звичайні зелені нитчаткі й епіфітні діатомеї; в мулі – хробаки, личинки хірономід, молюски (рис. 3.3).

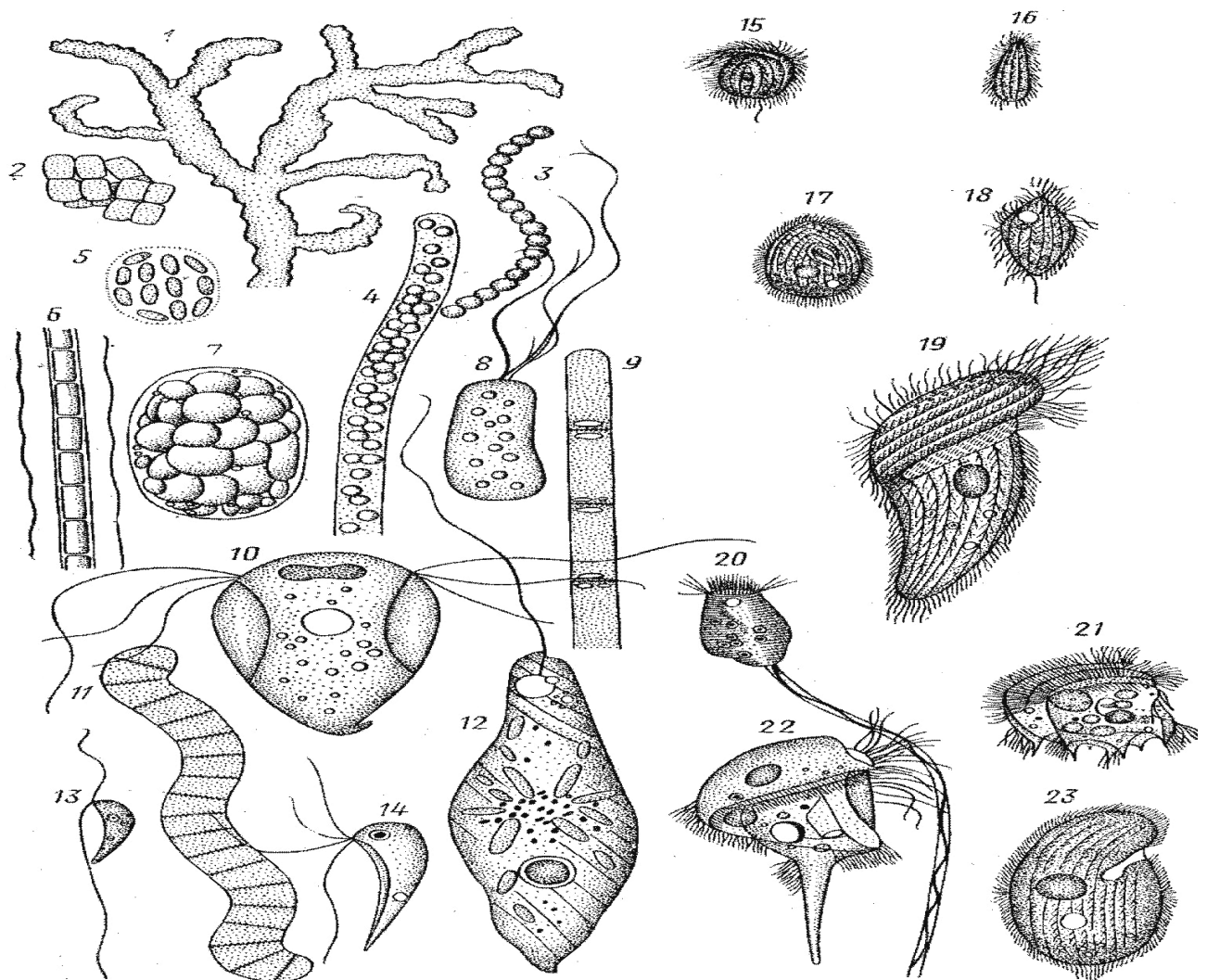


Рисунок 3.1 – Організми полісапробної зони:
1–11 – нитчасті бактерії; 12–14 – джгутіконосці; 15–23 – інфузорії

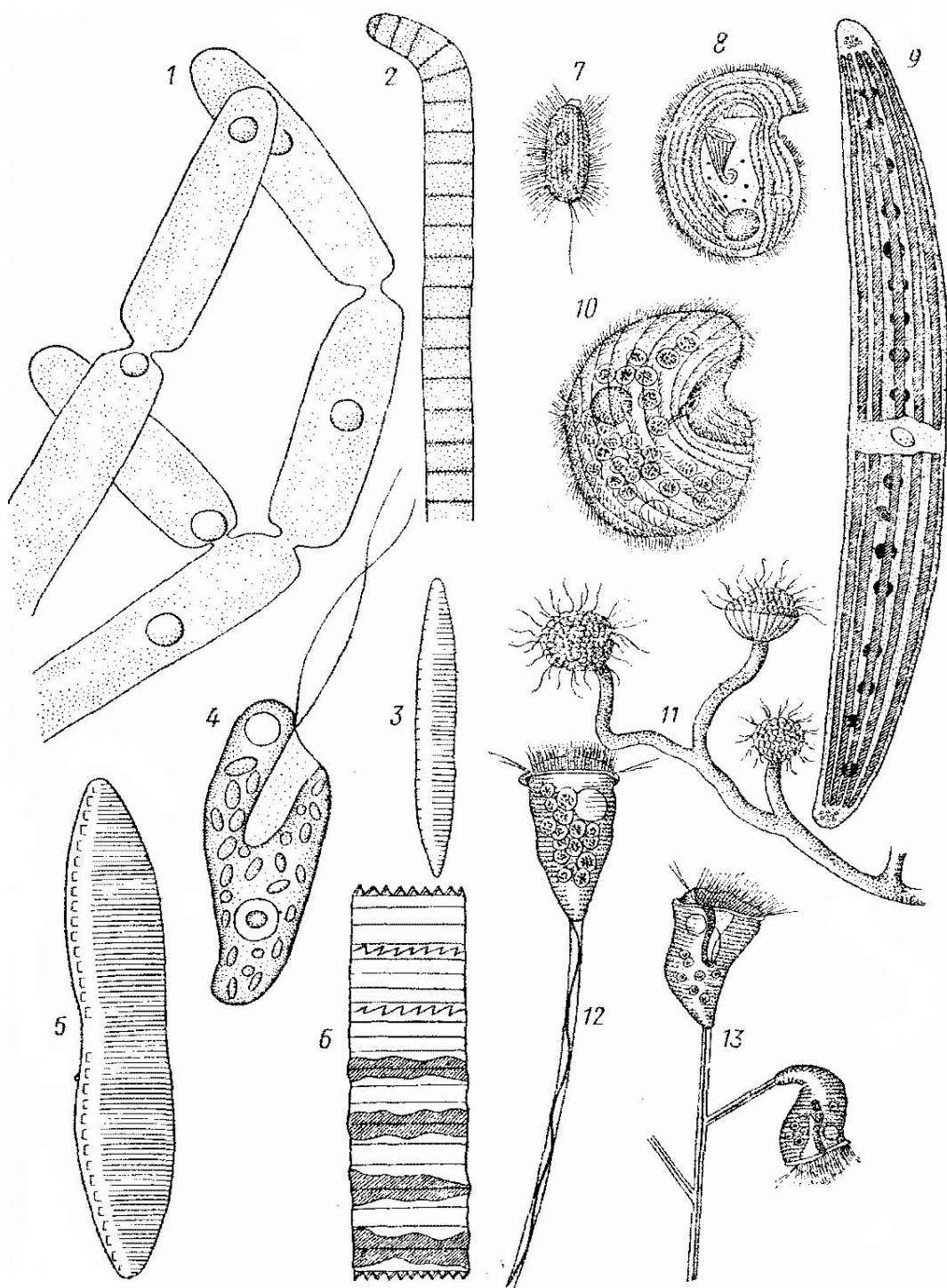


Рисунок 3.2 – Альфа-мезосапробні організми:
 1–3 – бактерії; 4 – одноклітинна водорість; 5–6 – багатоклітинні водорості;
 7–13 – інфузорії

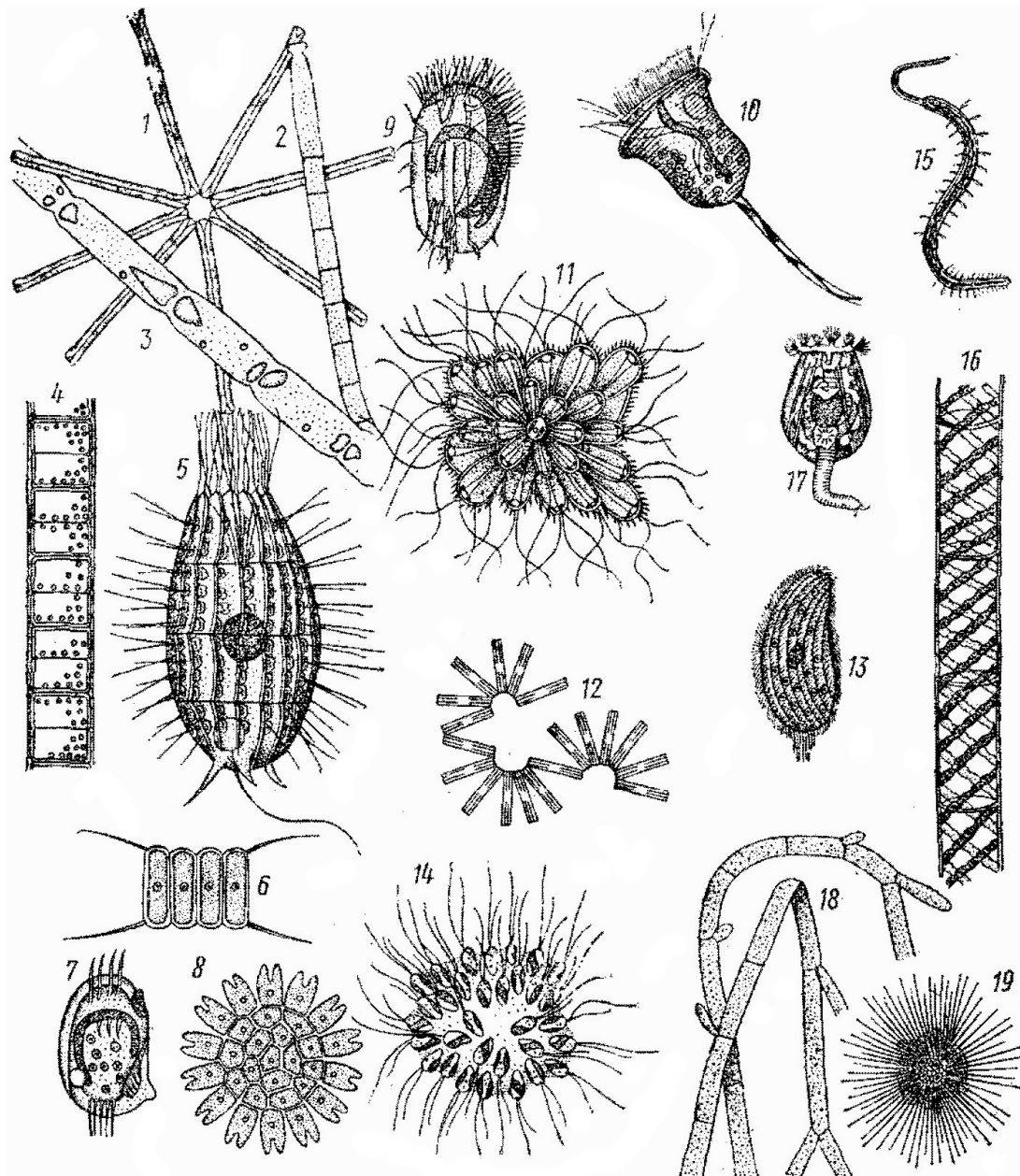


Рисунок 3.3 – Бета-мезосапробні організми:

1–3 – нитчасті бактерії; 4 – зелені водорості; 5–6 – водорості;
7–8 – жгутикові; 9–10 – інфузорії; 11–12 – водорості; 15 – кільчасті черви;
18–19 – гриби

Олігосапробна зона (o) характеризує практично чисті водойми з незначним вмістом нестійких органічних речовин і невеликою кількістю продуктів їх мінералізації.

Вміст кисню й вуглекислоти не зазнає помітних коливань у денні та нічні години доби. Цвітіння водоростей, як правило, не спостерігається. У донних відкладеннях міститься мало органічного детриту, автотрофних мікроорганізмів і бентосних тварин (хробаків, личинок хірономід і молюсків).

Показниками високого ступеня води в цій зоні є деякі червоні водорості й водні мохи (рис. 3.4).

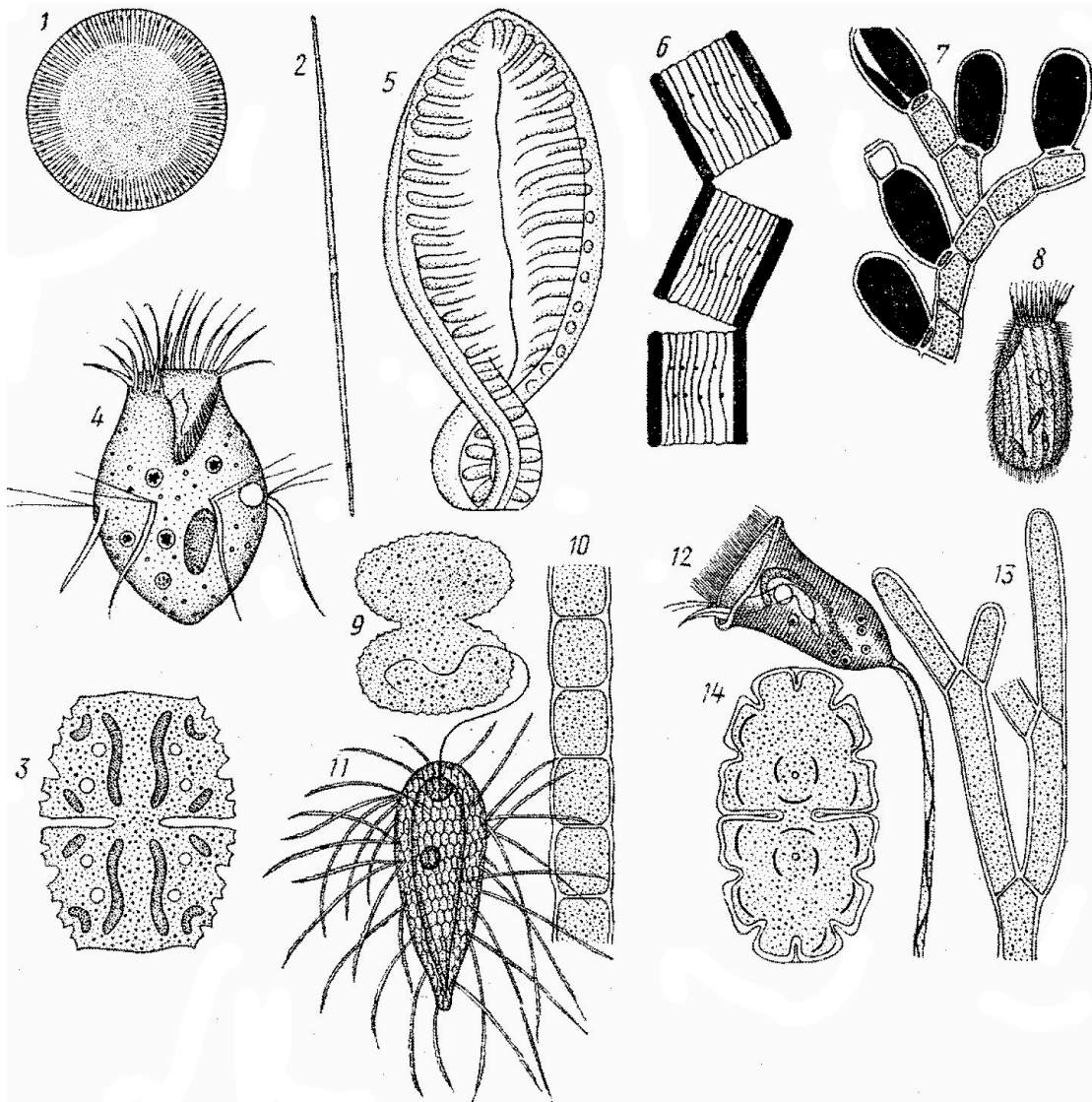


Рисунок 3.4 – Олігосапробні організми:

1–3, 6, 10, 13, 14 – водорості; 4, 8, 12 – інфузорії; 7 – кишковопорожнинні;
11 – личинка

Взагалі у процесі біологічного самоочищення зростає видове різноманіття, але чисельність кожного окремого виду зменшується:

- в олігосапробній зоні різноманітність видів досягає максимуму, проте чисельність окремих видів невелика;
- для полісапробної зони характерні невелика кількість видів і дуже висока чисельність кожного окремого виду.

Система сапробних організмів повністю відповідає екологічному принципу Тінеманна: «Чим більше умови існування даного

місцеперебування відрізняються від оптимальних для більшості видів, тим бідніше за видовою різноманітністю стає біоценоз і тим більш характерним і більш чисельним – кожен окремий вид».

Система Кольквітца і Марссона відразу набула широкого поширення та була використана для оцінки санітарного стану водойм, особливо в Європі і Росії. У нашій країні створено школу санітарних гідробіологів (Я. Я. Нікітінський, Г. І. Долгов, С. Н. Строганов, С. М. Вислоух та ін.), успішно застосовується і розвивається **система санітарно-біологічного аналізу**, тобто стан водойми визначається за тваринними і рослинними організмами.

Кольквітц і Марссон підкреслювали, що основне значення слід надавати не окремим видам, а біоценозам, тобто спільноті показових організмів.

Дуже чисті водойми практично не мають слідів впливу людини. У Росії, наприклад, до таких водойм можуть бути віднесені багато озер і річок Сибіру, півночі Далекого Сходу, а на європейській території – Ладозьке і Онезьке озера, Рибінське водосховище, деякі північні річки. У цих водоймах насичення води киснем досягає 95 %, БПК не перевищує 1 мг/л, а зважені речовини – 3 мг/л. Вода в дуже чистих водоймах придатна для всіх видів водокористування.

Водойми, що належать до категорії чистих, за хімічними показниками майже не відрізняються від дуже *чистих*, але сліди впливу діяльності людини виявляються, перш за все, у збільшенні кількості сапрофітної мікрофлори у воді. Водойми другого класу також придатні для всіх видів водокористування.

Помірно забруднені води характеризуються підвищеним вмістом органічних речовин, іонів хлору і солей амонію. Вони несуть на собі ознаки забруднення поверхневим стоком і побутовими стічними водами. Помірно забруднені води після відповідного очищення придатні для господарсько-питного використання, розведення деяких видів риб тощо.

До категорії *забруднених* належать річки й озера, природні властивості яких значно змінені в результаті надходження в них стічних вод. У зимовий період при утворенні крижаного покриву на забруднених ділянках водойми можуть створюватися анаеробні умови. Забруднені води непридатні для питного, господарсько-побутового та спортивного призначення, а також для рибництва. Вони можуть бути використані з обмеженнями в деяких виробничих процесах, для зрошення і судноплавства. У країнах Західної Європи, в умовах гострого дефіциту води, забруднені води використовують для господарсько-питного призначення, застосовуючи при цьому складні способи очищення.

У *брудних* і *дуже брудних водоймах* природні властивості води сильно змінені. У літній період вода цих водойм має неприємний запах. Підвищений вміст агресивної вуглекислоти і сірчистих сполук у воді брудних водойм

погано впливає на обшивку судів і портові споруди, внаслідок чого ці водойми обмежено придатні для судноплавства. Для зрошення води брудних водойм можуть бути використані з обмеженнями, не для всіх культур.

Для оцінювання ступеня забруднення водойми необхідно користуватись середніми даними, зібраними в період найбільш критичного стану водойми. Наприклад, найменша концентрація розчиненого кисню спостерігається влітку або в період льодоставу, найбільш висока температура влітку. За багатьма показниками найбільш несприятливі умови створюються взимку. Показники в цей період і приймаються за основу під час оцінювання ступеня забрудненості водойми.

3.2 Експериментальна частина

Завдання: провести порівняльний аналіз проб води, взятої з різних природних водойм. Виявити домінуючі види найпростіших. Зробити висновок про антропогенні фактори, що визначають якість води.

Матеріали та обладнання: предметне скло, покривне скло, піпетки, бюкси із зразками води з водойм, 0,1 % розчин желатину, вата, мікроскоп.

Хід роботи:

1. На предметне скло нанести краплю води, узятую з природного водоймища.

2. Для уповільнення руху найпростіших у краплю води додати невелику краплю розчину желатину і накрити покривним склом.

3. Помістити препарат на предметний столик мікроскопа, використовуючи гвинти предметного столика, поступово переміщувати препарат і реєструвати види найпростіших.

4. Визначити вид за описами інфузорій (Л / р № 2), фотографій (дод. А).

5. Провести мікроскопування проб води з різних природних водойм, що зазнають різного ступеня антропогенного впливу.

6. Заповнити таблицю 3.2.

Форма звітності: подати зошит із описом індикаторних організмів із заповненою таблицею 3.2 про ступінь сапробності водойми для кожного зразка.

Таблиця 3.2 – Сапробність природних водойм за видовим складом інфузорій

Природ- на водойма	Рівновійчасті інфузорії		Круговійчасті інфузорії		Спірально- війчасті інфузорії		Зона сапроб- ності
	Види	Чисель- ність	Види	Чисель- ність	Види	Чисель- ність	
1	1 2 та ін.						

Контрольні питання

1. Опишіть рівні сапробності та трофності природних вод.
2. Чим характеризується полісапробна зона?
3. Чим характеризується олігосапробна зона?
4. Чим характеризується мезосапробна зона?
5. Чим характеризується катаробна зона?
6. Які мікроорганізми домінують у кожній із сапробних зон?

Лабораторна робота № 4 САНІТАРНО-МІКРОБІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ ВОДИ

Мета роботи: провести санітарно-бактеріологічне дослідження проб води з різних джерел і оцінити можливість її використання для питних цілей.

4.1 Теоретичні відомості

4.1.1 Цілі і завдання санітарно-мікробіологічного дослідження води

Оскільки вода використовується під час виробництва будь-якого виду продукції, а також безпосередньо для їжі, відповідність її якості санітарно-мікробіологічних показників надзвичайно важлива. Водним шляхом можуть передаватися кишкові інфекції – холера, черевний тиф і паратифи, сальмонельоз, дизентерія, гепатит А, поліомієліт, а також лептоспірози, сибірка, туляремія, туберкульоз, сап, Ку-лихоманка, різні грибкові захворювання. У зв'язку з цим основною метою санітарно-мікробіологічного дослідження води є визначення наявності в ній патогенної і умовно патогенної мікрофлори, і, отже, джерела цього попадання, а також попередження поширення інфекційних захворювань серед населення.

Санітарно-мікробіологічне дослідження води проводиться в таких випадках:

1. під час вибору джерела централізованого господарсько-питного водопостачання і періодичного контролю цього джерела;
2. під час контролю ефективності знезараження питної води централізованого водопостачання;
3. під час спостереження за підземними джерелами централізованого водопостачання (артезіанські свердловини, ґрунтові води тощо);
4. під час визначення стану і ступеня придатності води джерел індивідуального водокористування (колодязів, джерел тощо);
5. під час спостереження за санітарно-епідеміологічним станом води відкритих водойм: водосховищ, ставків, озер, річок;

6. під час контролю ефективності знезараження води плавальних басейнів;
7. під час перевірки якості та ступеня очищення стічних вод;
8. під час визначення вогнища водних спалахів інфекційних хвороб.

Усі санітарно-мікробіологічні дослідження води регламентуються відповідною нормативно-технічною документацією (НТД) (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Перелік нормативно-технічної документації по санітарно-мікробіологічному контролю води

<i>Назва документів</i>	<i>НТД</i>
Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною	СанПіН 2.2.4-171-10
Джерела централізованого господарсько-питного водопостачання. Гігієнічні, технічні вимоги та правила вибору	ГОСТ 2761-84
Вода питна. Методи санітарно-бактеріологічного аналізу	ГОСТ 18963-73
Охорона природи. Гідросфера. Гігієнічні вимоги до зон рекреації водних об'єктів	ГОСТ 17.1.5.02-80
Охорона природи. Гідросфера. Правила контролю якості морських вод	ГОСТ 17.1.3.08-82
Вода питна. Польові методи санітарно-мікробіологічного аналізу	ГОСТ 24849-81
Вимоги до якості води нецентралізованого водопостачання. Санітарна охорона джерел	СанПіН 2.1.4.544-96

Під час санітарно-мікробіологічного дослідження води визначаються різні показники залежно від поставленого завдання і характеру досліджуваного об'єкта (табл. 4.2).

Таблиця 4.2 – Орієнтовні показники, контрольовані у воді з різних джерел

<i>Об'єкти дослідження</i>	<i>Обов'язкові дослідження</i>	<i>Додатково рекомендовані</i>
1	2	3
Вода питна централізованого господарсько-питного водопостачання	Число колоній сапрофітів БГКП	E. coli

Продовження таблиці 4.2

1	2	3
Вода питна при нецентралізованому використанні місцевих джерел	БГКП	
Вода підземних джерел централізованого водопостачання	Число колоній сапрофітів БГКП	E. coli
Вода поверхневих джерел централізованого господарсько-питного водопостачання в межах населених пунктів	ЛКП	Число колоній сапрофітів E. coli; ентерококи; коліфаги; сальмонели; шигели; ентеровіруси
Вода у водних об'єктах у рекреації	ЛКП	Число колоній сапрофітів E. coli; ентерококи; коліфаги; стафілококи; сальмонели; шигели; ентеровіруси
Вода купально-плавальних і спортивних басейнів із прісною та морською водою	БГКП Число колоній сапрофітів Стафілококи	Ентеровіруси; E. coli
Господарсько-побутові стічні води після очищення та знезараження	ЛКП	Сальмонели; шигели; ентеровіруси

4.1.2 Методи санітарно-мікробіологічного дослідження води

Відбір проб води

Важливим правилом є дотримання стерильності: забір води роблять у стерильний посуд стерильними приладами і обов'язково продезінфікованими (денатурованим етиловим спиртом або іншим дезінфікуючим засобом) руками.

Відбір проб води виконує санітарний лікар, його помічник або спеціально проінструктований співробітник лабораторії. Достовірність отриманих результатів і висновків залежать від правильності забору проб. Вода для санітарно-бактеріологічного аналізу забирається в обсязі 0,5 л у скляні бутлі або флакони, закриті ватно-марлевими пробками і зав'язані зверху паперовими ковпачками. За необхідності дослідження води на наявність збудників кишкових інфекцій кількість води збільшують до 2,5 л.

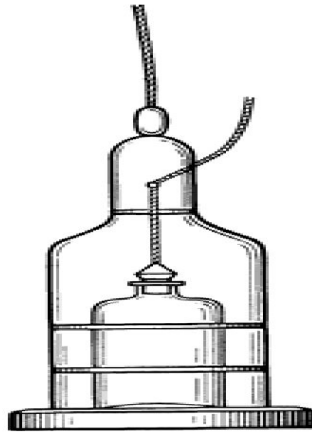


Рисунок 4.1– батометр

Для взяття проб води з глибини (відкритих водойм, колодязів, басейнів тощо) використовують спеціальні прилади: батометр, прилади Ісаченко, Рутнер та ін. Батометр являє собою металевий каркас довжиною 0,5–1 м (рис. 4.1). Каркас виготовляється з металу, що не піддається корозії, і може компактно складатися, оскільки складається з окремих кілець. Дно каркаса свинцеве і служить грузилом. Всередину встановлюють стерильну бутель, закриту стерильною гумовою або корковою пробкою з кільцем, до якого прив'язана мотузка.

При зануренні у воду на необхідну глибину, потягуючи за мотузку, пробку відкривають, посудина заповнюється водою, про що свідчить припинення появи бульбашок повітря на поверхні води. Мотузку опускають, бутель автоматично закривається. Після вилучення батометра притерту пробку замінюють стерильною ватною (яка повинна бути загорнута в папір і перебувати в комплекті з батометром). Для взяття проб з великої глибини (понад 30 м) можна використовувати прилади Ісаченко, Рутнер, Романенко-Младова.

За відсутності батометрів пробу води можна відбирати за допомогою бутлі, в пробку якої монтують дві скляні трубки, з'єднані гумовим шлангом. Одна трубка довга і доходить до дна пляшки, інша коротка. До гумовому шлангу прив'язують мотузку. Бутель на тросі опускають у водойму і на заданій глибині, смикнувши за мотузку, знімають гумову перемичку зі скляних трубок, вода починає надходити в довгу трубку, а через коротку виходить повітря. Після відбору проби бутель виймають із водойми, тут же закривають ватяними пробками отвори скляних трубок і відправляють на дослідження.

Для взяття проб питної води використовують склянки ємністю 0,5–1 л. Для взяття проб води з кранів, їх попередньо обпалюють полум'ям палаючого ватного тампону, змоченого спиртом, потім повністю відкривають і протягом 10 хв воду спускають. Воду наливають у бутлі з дотриманням стерильності, не змочуючи шийку, щоб не допустити замочування пробки. Джерельну воду беруть безпосередньо зі струменя або із середини поточного

джерела, на відстані 10–15 см від поверхні і дна. Артезіанську й колодязну воду забирають на глибині 10–15 см від поверхні води. З ополонки проби відбирають на глибині 10–15 см від нижнього краю льоду. Із відкритих водойм, як правило, беруть серію проб на різній відстані від берега на різній глибині з урахуванням місця водозабору та руху води.

Проби стічних вод також забирають у стерильні бутлі. Проте обсяг кожної проби може коливатися від 500 до 10 мл залежно від місця взяття (під час перевірки окремих етапів очищення, після обробки, перед скиданням у водойму) і від завдань аналізу.

Зберігання та транспортування проб води

Всі взяті для дослідження проби води нумеруються, в супровідному документі має бути зазначено найменування водойми, вододжерела, його місцезнаходження; опис місця відбору проб (для водойм – відстань від берега і глибина), близькість джерел забруднення; швидкість течії; метеорологічні умови – температура води, повітря, наявність опадів, вітру, хвиль тощо; дата взяття проби (час, число, місяць, рік); мета дослідження. Супровідний документ підписується особою, яка брала пробу, із зазначенням посади.

Транспортувати воду слід у сумках-холодильниках або в ящиках з термоізоляційною прокладкою (температура в яких не більше 1-2 °С), запобігати різким поштовхам (щоб не замочити пробки), замерзанню, дії сонячних променів.

Дослідження води повинно бути проведено не пізніше 2 год із моменту відбору проби, лише як виняток допускається зберігання проби до 6 годин за температури 4-5 °С. За більш тривалого і неправильного зберігання може відбутися розмноження або загибель мікрофлори.

Доставлені проби води реєструють у спеціальному журналі з пронумерованими і прошитими сторінками.

Визначення числа сапрофітних мікроорганізмів

До сапрофітних мікроорганізмів, що населяють водойми, належать мезофільні та факультативні анаероби, здатні на живильному середовищі утворювати колонії, видимі при збільшенні в 2–5 разів. Кількість мікроорганізмів, що виростають у вигляді колоній, відповідає ступеню забруднення води органічними речовинами, що характеризує стан води. Тому загальну кількість сапрофітних бактерій слід розглядати як суттєвий непрямий показник санітарного стану води.

Визначення загального мікробного числа води можна проводити методом серійних десятикратних розведень із посівом на м'ясопептонний агар (МПА) і методом прямого мікроскопічного підрахунку мікроорганізмів у досліджуваній воді.

При визначенні першим методом посіви вирощують залежно від мети дослідження за температури 37 °С протягом 24 год, або за 20–22 °С – 48 год,

або – обох температурних режимів паралельно. Наприклад, під час вибору нового джерела водопостачання визначають дві групи сапрофітів: 1) виростають за температури 20–22 °С протягом 48 год, 2) виростають за температури 37 °С протягом 24 год. За температури 20 °С виростає більша кількість сапрофітів, і саме вони є найбільш активними учасниками процесу самоочищення водойми. У місцях великого забруднення стічними водами чисельні значення обох груп сапрофітів мало відрізняється, тому динаміка чисельності цього показника вважається чутливим індикатором забруднення водойм, особливо органічними речовинами. При визначенні числа сапрофітів за двох температурних режимів роблять паралельно кожен посів на 2 чашки Петрі із середовищем (у двох повторюваностях). Обсяг води для посіву вибирають із таким розрахунком, щоб на чашках виросло не менше 20, але не більше 300 колоній (табл. 4.3). Перед посівом проби ретельно перемішують, потім готують 10-кратні розведення (при сильному забрудненні). Засів кожного розведення – в кількості 1 мл глибинним способом.

Після інкубації (при 20 °С і 37 °С) підраховують всі колонії, які виростили як на поверхні середовища, так і в її глибині. При прямому підрахунку зі зворотного боку дна чашки олівцем по склу відзначають кожну розраховану колонію (щоб не врахувати її двічі).

Якщо на агарі в чашках виросло багато колоній (більше 300) або вони розпливчасті, а аналіз не можна повторити, то підрахунок можна вести за допомогою спеціальних камер або приладу для підрахунку колоній (рис. 4.2). Цей прилад значно полегшує підрахунок, оскільки він ведеться за допомогою лупи, що дає збільшення колоній в 2 рази, це прискорює роботу і спрощує процес визначення кількості колоній. Апарат складається з металевого корпусу, на верхній частині якого знаходиться кругла пластинка з термостійкого матового скла з нанесеною на ньому сіткою.

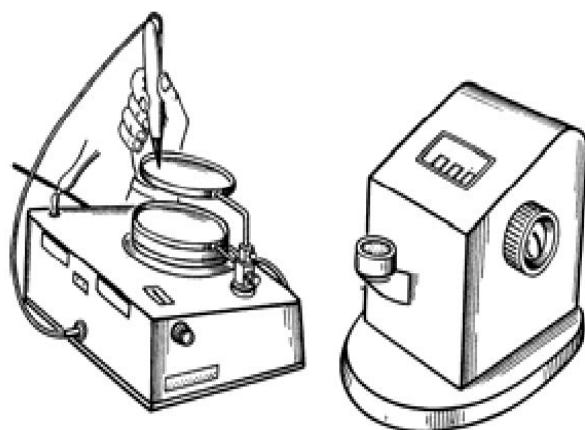


Рисунок 4.2 – Прилад для підрахунку колоній у чашках

Таблиця 4.3 – Схема посіву води з різних об'єктів методом мембранних фільтрів і прямим посівом

Об'єкт дослідження	Обсяг засіваємої води (в мілілітрах) для визначення		
	сапрофітів	БГКП, ЛКП, E. coli	Ентерококів
Вода питна централізованого водопостачання	1; 0,1	200;133 або 300 100, 30, 3	500 або 333
Водні об'єкти, що не забруднені стічними водами	1; 0,1 або 1; 0,1; 0,01	40, 10, 1	50, 10
Водні об'єкти, забруднені стічними водами	1; 0,1; 0,01 або 0,1; 0,1; 0,001	10; 1; 0,1 або 1; 0,1; 0,01	10, 1, 0,1
Стічні води до очищення і знезараження	Від 0,001 до 0,000 001	Від 0,01 до 0,000 001 або от 0,001 до 0,000 001	Від 0,1 до 0,000 1 або от 0,01 до 0,000 001
Стічні води після очищення	Від 0,01 до 0,000 01	Від 1 до 0,000 01 або от 1 до 0,000 1	Від 1 до 0,000 01

Під склом вмонтована електрична лампочка, яка освітлює сітку. Чашка з посівом, поміщена на скло, знизу підсвічується.

Підрахунок колоній ведеться за допомогою електропера авторучки, з'єднаної з автоматичним лічильником. Під час кожного натискання на ручку (в момент нанесення на зворотному боці дна чашки точки пером у місці знаходження колоній) на електроконтакт автоматичного лічильника надходить імпульс, що реєструється появою чергової цифри на табло лічильника.

Кінцевий результат – $ЗМЧ$ – розраховують за формулою:

$$ЗМЧ = (K \cdot P) / V, \quad (4.1)$$

де $ЗМЧ$ – загальне мікробне число колонієутворювальних одиниць (КУО) мікроорганізмів в 1 мл досліджуваної води;

K – кількість колоній на чашці Петрі;

P – фактор розведення;

V – об'єм, що засівають на чашку, мл.

Обчислюють середньоарифметичну величину для кожного розведення (при засіву на 2 і більше чашок Петрі паралельно). Якщо колоній зросло так багато, що вони не піддаються рахунку, або спостерігається зростання

розпливчастих колоній на всій поверхні агару, то відзначають «суцільне повзуче зростання».

Цей метод вперше був запропонований у 1932 р. А. С. Разумовою. Суть методу полягає в концентрації бактерій на мембранних фільтрах (за умови пропущення через них досліджуваної води), подальшому фарбуванні еритрозином і мікроскопірованню..

Прямий мікроскопічний метод визначення загальної кількості мікроорганізмів

Прямий метод зручний тим, що результат, тобто кількість мікроорганізмів у 1 мл води, може бути отриманий протягом декількох годин. Тому рекомендується використовувати прямий метод, якщо необхідно дати швидку санітарну оцінку води: при оцінці процесу природного самоочищення водойм, ефективності роботи очисних споруд на всіх етапах тощо. Для фільтрування води використовують мембранні фільтри, фільтр Зейтца (рис. 4.3) або спеціальний апарат Долгова-Разумова. Мембранні фільтри – тонкі (0,1-0,5 мм) круглі пластинки з нітроклітковини або ацетилцелюлози діаметром 35 мм. Залежно від розміру пір розрізняють фільтри марки Ф (фільтруючі): № 1 – 350 нм; № 2 – 500 нм; № 3 – 700 нм; № 4 – 900 нм; № 5 – 1200 нм.

Прямий метод зручний тим, що результат, тобто кількість мікроорганізмів у 1 мл води, може бути отриманий протягом декількох годин.

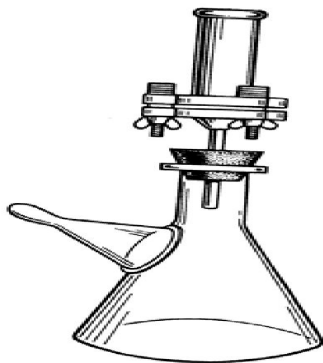


Рисунок 4.3 – Фільтр Зейтца

Фільтри з осілими на них мікроорганізмами висушують, поміщаючи на фільтрувальний папір у чашках Петрі в термостат або у сушильну шафу, а потім забарвлюють карболовим еритрозином (5 г еритрозина на 100 мл 5 % розчину фенолу). Під час фарбування фільтри кладуть нижньою поверхнею в чашку Петрі на фільтрувальний папір, попередньо змочений еритрозином, і витримують протягом 1 год (можна до 18 год) із закритою кришкою. Забарвлення і подальше промивання препарату відбувається через пори мембранного фільтра. Залишки еритрозина відмивають, поміщаючи фільтр у

чашку Петрі на фільтрувальний папір, змочену дистильованою водою. Так роблять 3–5 разів, перекладаючи фільтр із однієї чашки в іншу на папір, змочений дистильованою водою, поки папір під фільтром не перестане забарвлюватися. Після останнього промивання поверхня фільтра залишається рожевою (за рахунок забарвлених бактерій), а краї стають блідо-рожевими

Потім мембранний фільтр із пофарбованими мікроорганізмами висушують і поміщають на предметне скло, попередньо капнув краплю імерсійного масла на скло і на фільтр, який накривають тонким покривним склом. Мікроскопують із імерсійним об'єктивом, в окуляр вкладають сітчастий мікромметр, розділений на дрібні квадрати. Підраховують мікроорганізми в 20 полях зору (в кожному полі зору в 4 маленьких квадратах, розташованих по діагоналі). Розрахунок загальної кількості бактерій в 1 мл (X) ведеться за формулою

$$X = \frac{S \cdot N \cdot 10^6}{S_1 \cdot V}, \quad (4.2)$$

де S – фільтруюча площа приладу, мм²;

10^6 – перекладний коефіцієнт квадратних міліметрів у квадратні мікромметри;

N – середня кількість бактерій у одному квадраті;

S_1 – площа квадрата окулярного мікромметра, мкм²;

V – об'єм профільтрованої води, мл.

Визначення бактерій групи кишкових паличок

Поняття «*бактерії групи кишкових паличок*» включає різних представників сімейства Enterobacteriaceae: родів Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella та ін. За нормативною документацією до БГКП відносяться грамнегативні, що не утворюють спор палички, що мають оксидазної активності, ферментують лактозу з утворенням кислоти і газу за температури 37 °С протягом 5–24 год (дод. Б, табл. 1). За міжнародною класифікацією такі мікроорганізми належать до загальних колиформних бактерій (ЗКБ). Вони потрапляють у навколишнє середовище, в тому числі і у воду, з випорожненнями людини і тварин, тому виявлення їх свідчить про фекальне забруднення та епідемічної небезпеки щодо кишкових інфекцій.

БГКП (ЗКБ) можна визначати двома способами: методом мембранних фільтрів і титраційним (бродильним) методом.

Дослідження води методом мембранних фільтрів.

Метод заснований на фільтрації встановленого обсягу води через мембранні фільтри, вирощуванні посівів на диференційно-діагностичному середовищі і подальшій ідентифікації колоній за культуральними та біохімічними ознаками.

Перед застосуванням мембранні фільтри перевіряють на відсутність тріщин, отворів, бульбашок і кип'ятять у дистильованій воді протягом 10 хв (при цьому не можна допускати скручування фільтрів). Для повного видалення з фільтрів залишків розчинників, які застосовуються під час їх виготовлення, кип'ятіння слід повторити 3-5 разів зі зміною дистильованої води. Підготовлені таким чином фільтри зберігаються в банках з дистильованою водою або сухими. У день постановки досліду фільтри повторно стерилізують кип'ятінням у дистильованій воді протягом 10 хв.

Фільтрування проводять за допомогою спеціальних приладів або фільтра Зейтца (рис. 4.3). Перед посівом води апарат стерилізують фламбування. Після охолодження на фільтрувальний столик, на якому є сітка, стерильним пінцетом поміщають мембранний фільтр, притискають його лійкою або металевим циліндром і щільно закріплюють спеціальними гвинтами. Відросток колби, в якій фільтрується вода, за допомогою гумової трубки з'єднують з водоструминним або масляним насосом для створення вакууму в приймальній посудині (близько 0,25 атм).

Обсяг води для посіву вибирають із урахуванням таблиці 5.3, він повинен бути таким, щоб на фільтрі виросло не більше 30 ізольованих колоній. *Рекомендований обсяг питної води* – 300 мл. Досліджувану воду кожного обсягу фільтрують не менше ніж через 2 фільтри.

У воронку або стакан наливають необхідні обсяги води, починаючи з менших, а потім великі, щоразу змінюючи фільтри. Найменший обсяг води – 1 мл – слід очищувати через фільтр, попередньо змочений стерильною водою. Після фільтрування верхню частину приладу знімають, і фільтр обережно (зберігаючи вакуум для видалення надлишку вологи на фільтрі) стерильним пінцетом переносять на середовище Ендо у чашку Петрі. Фільтр укладають вгору поверхнею, на якій осіли бактерії, уникаючи появи бульбашок повітря між фільтром і середовищем. На одну чашку можна помістити 4 фільтри, під кожним на дні чашки слід надписати обсяг води, номер проби і число. Якщо вода каламутна, то фільтрування проводиться відразу через два фільтри: попередній фільтр № 6 (для затримання великих часток) поміщають на фільтр № 2. Після фільтрування обидва фільтри переносять на середовище Ендо. Чашки із фільтрами поміщають у термостат та інкубують за температури 37 °С протягом 24 год. Для остаточного результату враховують колонії, що виросли на обох фільтрах.

При наявності у воді БГКП (ОКБ) на фільтрах з'являється зростання типових для цих бактерій колоній: темно-червоні з металевим блиском або червоні, рожеві з червоним центром, мають чіткий відбиток на зворотному боці фільтра. Бактерії з таких колоній забарвлюють за Грамом і проводять мікроскопіювання. Забарвлення за Грамом можна замінити на тест Грегерсена (додаток Б). З культурою грамнегативних бактерій лактозопозитивних колоній проводять оксидазний тест (дод. Б) для диференціації бактерій родини *Enterobacteriaceae* від *Pseudomonadaceae*

(останні є оксидутворювальними бактеріями). Частину оксиднегативної **Гр (-)** ізольованої колонії засівають у пробірку з напіврідким лактозним середовищем і інкубують за 37 °С 48 год. У разі появи кислоти і газу за більш короткий проміжок часу результат вважають позитивним. Індекс ОКБ (БГКП) розраховують за формулою

$$\text{індекс ОКБ(БГКП)} = \frac{K \cdot 1000}{V}, \quad (4.3)$$

де K – кількість перевірених на належність до ОКБ (БГКП) колоній на фільтрах;

V – об'єм води, очищеної через фільтри, на яких вівся облік.

Наприклад, профільтровано по 100 мл у трьох повторностях, на одному фільтрі виросло 5 колоній, на іншому – 2, на третьому немає зростання.

Індекс ОКБ буде дорівнювати: $[(5+2) \cdot 1000] : 300 = 23 \text{ КОЕ}$ (колонієутворювальних одиниць). Для переведення індексу в титр використовують формулу (4.1), для розглянутого випадку: Титр = $1\,000 : 23 = 43,5$ мл. Відповідно до СанПіН, у води питної індекс ОКБ повинен бути не більше 3.

Метод мембранних фільтрів є сучасним, точним, менш трудомістким і більш дешевим порівняно з титраційним методом. Він зручний і тим, що дозволяє концентрувати бактерії, що містяться в значних обсягах води на невеликій поверхні фільтра. Проте одним із найбільш істотних недоліків методу є те, що виявляється менша кількість бактерій порівняно з титраційним. Для більшої точності рекомендується дослідження води проводити паралельно обома методами.

Титраційний метод дослідження води

Метод заснований на накопиченні бактерій після посіву встановленого обсягу води в рідке живильне середовище з подальшим пересіванням на диференційно-діагностичне середовище та ідентифікацією колоній за культуральними та біохімічними тестами.

Обсяг води, що засівається, залежить від характеру досліджуваного об'єкта, але обов'язково посів ведеться в 2-3, а в деяких випадках у 5-ти повторностях.

Обсяги води вибирають з таким розрахунком, щоб у одному розведенні отримати хоча б один негативний результат (табл. 5.4).

Посів води проводиться в глюкозопептонне середовище (ГПС): 100 мл води – в 10 мл концентрованого середовища, 50 мл – в 15 мл концентрованого середовища, 10 мл – в 1 мл також концентрованого середовища; 1 мл і наступні розведення – в 10 мл глюкозопептонного середовища нормальної концентрації. Великі обсяги води засіваються у флакони або колби, менші – в

пробірки. Посіви інкубують у термостаті протягом доби за температури 37 °С.

Таблиця 4.4 – Схема посіву води з різних об'єктів за титраційним методом

Об'єкт дослідження	Обсяги засіюваної води (в мл) для визначення	
	БГКП, ЛПК, E. coli	ентерококів
Вода питна централізованого водопостачання	3 повторності по 100, 10, 1	2 або 3 повторності по 100, 10, 1
Вода нецентралізованого водопостачання і плавальних басейнів	50, 5 повторностей по 10, 1 або 2 повторності по 100, 10, 1 и 0,1	2 або 3 повторності по 100, 10, 1
Водні об'єкти, що не забруднені стічними водами	50, 5 повторностей по 10, 1 або 2-3 повторності по 10; 1; 0,1; 0,01	50, 5 повторностей по 10, 1 або 2-3 повторності по 10; 1; 0,1; 0,001
Водойми, що забруднюються стічними водами	2-3 повторності по 1; 0,1; 0,01; 0,001 або 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,00 01; 0,000 01	2-3 повторності по 10; 1; 0,1; 0,01
Стічні води до очищення і знезараження	Від 0,01 до 0,000 000 001	Від 0,1 до 0,000 000 01
Стічні води після очищення і знезараження	Від 0,1 до 0,000 000 01	Від 0,1 до 0,000 001

Із пробірок з посівами, в яких спостерігається помутніння (а також утворення кислоти й газу), роблять висів на сектори в чашки із середовищем Ендо. Посіви витримують і термостаті за температури 37 °С протягом 16–18 год. За наявності на середовищі Ендо характерних для БГКП (ОКБ) колоній (червоних із металевим блиском) слід провести всі тести, перераховані вище. Позитивна відповідь на наявність БГКП дається в тому випадку, якщо спостерігається зростання характерних колоній, утворених оксиднегативними, Гр (-) бактеріями, що зброджують лактозу за 37 °С з утворенням кислоти і газу. Звертають увагу також на відбиток, забарвлений в червоний колір, на середовищі після зняття досліджуваної колонії. Таким чином, позитивна відповідь видається через 40–42 год. Так само, як і за визначення БГКП методом мембранних фільтрів, якщо на середовищі Ендо вирости лактозонегативні колонії (рожеві, безбарвні, дрібні червоні), то їх належність до БГКП (ОКБ) підтверджується забарвленням за Грамом, негативним оксидазним тестом, здатністю ферментувати лактозу до кислоти і

газу за температури 37 °С і відсутністю протеолітичної активності (при посіві на середовище Ендо з молоком).

Результат виражається у вигляді індексу (титру) БГКП або ОКБ, цифровий вираз яких визначають за таблицею 4.5.

Таблиця 4.5 – Розрахунок найбільш ймовірного числа бактерій у 1 л води

Число позитивних результатів із 3 обсягів			Індекс ОКБ (БГКП)	Титр ОКБ (БГКП)	Число позитивних результатів із 3 обсягів			Індекс ОКБ (БГКП)	Титр ОКБ (БГКП)
по 100 мл	по 10 мл	по 1 мл			по 100 мл	по 10 мл	по 1 мл		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0	0	< 3	> 333	3	0	0	23	43
0	0	1	3	333	3	0	1	39	26
0	1	0	3	333	3	0	2	64	16
1	0	0	4	250	3	1	0	43	23
1	0	1	7	143	3	1	1	75	13
1	1	1	11	91	3	1	2	120	8
1	2	0	11	91	3	2	0	93	11
2	0	0	9	111	3	2	1	150	7
2	0	1	14	72	3	2	2	210	5
2	1	0	15	67	3	3	0	240	4
2	1	1	20	50	3	3	1	460	2
2	2	0	21	48	3	3	2	1100	0,9
2	2	1	28	86	3	3	3	>1100	<0,9

Визначення термотолерантних коліформних бактерій (ТКБ)

З усіх бактерій, що входять до складу БГКП, найбільше санітарно-показове значення мають мікроорганізми роду *Escherichia*. За здатністю розщеплювати лактозу за температури 37 °С з БГКП (ОКБ) прийнято виділяти Гр (-) бактерії, які здатні ферментувати лактозу за температури 44,5 °С. До них належать *E. coli*, що не росте на цитратному середовищі. Відповідно до міжнародної класифікації цю групу бактерій називають *термотолерантні коліформні бактерії – ТКБ*.

Число ТКБ характеризує ступінь фекального забруднення води водних об'єктів і побічно визначає епідемічну небезпеку щодо збудників кишкових інфекцій. ТКБ визначають тими ж методами, що і БГКП (ОКБ), крім останнього етапу ідентифікації, який проводиться за ферментацією лактози на напіврідкому живильному середовищі за 44,5 °С. У разі зростання на

середовищі Ендо типових лактозопозитивних колоній, Гр (-), оксиднегативних, здатних ферментувати лактозу за 44,5 °С, їх ураховують як ТКБ, індекс або титр визначають за таблицею 4.5.

Визначення *E. coli*

Визначення *E. coli* є додатковим показником для розшифрування походження біологічної контамінації, визначення свіжості фекального забруднення під час оцінювання якості води в разі перевищення нормативу. Таке дослідження проводиться під час періодичних аналізів води, а також у разі несподіваних змін основних показників – індексу ОКБ, ТКБ.

Група бактерій, умовно позначених як *E. coli*, включає лактозопозитивні кишкові палички, які ферментують лактозу до кислоти і газу за температури 43–44,5 °С в присутності інгібіторів сторонньої мікрофлори та утворюють індол за тієї ж температури. Переважно це бактерії роду *Escherichia*, але можуть бути віднесені до цієї групи і представники інших родів, що мають такі ж властивості (наприклад, *Citrobacter* та ін.). *E. coli* визначають тими ж методами: мембранних фільтрів, прямого посіву і титраційним.

Різниця – на етапі дослідження властивостей мікроорганізмів, які виросли на середовищі Ендо. Результат дослідження висловлюють кількістю *E. coli* в 1 л (Coli-індекс).

Метод прямого посіву застосовується під час визначення *E. coli* в стічних водах і сильно забруднених водоймах. На чашки із середовищем Ендо засівають по 0,1–0,5 мл проби води (по 4 дози з кожної проби), ретельно втирають шпателем і інкубують протягом 16–18 год при температурі 37 °С. Ураховують зростання характерних колоній, визначають біохімічні властивості бактерій і визначають колі-індекс, орієнтуючись за таблицею.

Визначення ентерококів

Ентерококи в останні роки привертають до себе увагу як мікроорганізми – показники фекального забруднення. Вони виявляються в навколишньому середовищі, куди потрапляють із випорожненнями людини, тварин, птахів, комах, будучи постійними мешканцями кишечника. У ґрунті та воді вони зберігаються до 6 тижнів, але не розмножуються і не змінюють свої основні біологічні властивості. Виживання ентерооків у воді наближається до виживання патогенних ентеробактерій. Вони стійкі до підвищення температури (нагрівання до 55–60 °С витримують протягом 1 год), добре переносять низьку температуру, мають значну стійкість до хлору. Все це дає право вважати ентерококи другим після кишкової палички санітарно-показовим мікроорганізмом під час дослідження води.

Особливе значення має визначення ентерооків у воді плавальних басейнів як більш стійких до дії знезаражувальних речовин, ніж БГКП.

Визначення ентерококів проводять методом мембранних фільтрів, титраційним, а за великого забруднення води (понад 30 бактерій на 1 мл) – методом прямого посіву.

Суть методу мембранних фільтрів полягає в концентрації ентерококів із певного обсягу води на мембранних фільтрах із наступним підрощуванням мікробів на спеціальних середовищах, ідентифікації та визначенні індексу ентерококів.

Обсяг води (2-3 десятикратних розведення) вибирають із таким розрахунком, щоб на фільтрах виросло не менше 10 і не більше 50 ізолюваних колоній (орієнтуючись за таблицею 4.5). Фільтри, через які пропускають вибрані обсяги води, поміщають у чашки Петрі на сланець або жовчне середовище і інкубують при температурі 37 °С протягом 24 год. На середовищі сланець вирастають характерні колонії: невеликі, опуклі, круглі, темно-вишневі або рожеві з темно-вишневим центром (забарвлення колоній залежить від ступеня відновлення ТТХ). На жовчному середовищі колонії плоскі, великі, з рівними краями, білі з кремовим або рожевим відтінком, а також малинові. Малиновий колір характерний для колоній *S. faecalis*. Належність колоній до ентерококів підтверджується мікроскопією мазків, забарвлених за Грамом, і відсутністю каталазної активності (дод. Б).

Підраховують кількість колоній, що виросли, і обчислюють число ентерококів у досліджуваній воді, виходячи з обсягів води, профільтрованої через мембранні фільтри. Загальну кількість колоній ділять на обсяг води і множать на 1 000.

Сутність титраційного методу визначення ентерококів полягає в посіві різних обсягів досліджуваної води в рідку елективну середу для накопичення мікроорганізмів із подальшим висівом на щільне молочно-інгібіторне середовище для отримання окремих колоній, їх ідентифікації і підрахунку індексу ентерококів. Титраційний метод дає більш точні кількісні дані про вміст ентерококів у воді. Обсяги води вибирають із таким розрахунком, щоб при найбільш високому розведенні спостерігався один або кілька негативних результатів (при цьому слід орієнтуватися на табл. 4.5). Кожен обсяг або розбавлення досліджуваної води засівають у 2 або 3 повторностях. Обсяги води 100 мл і 10 мл засівають у 100 і 10 мл (відповідно) у лужно-поліміксинове середовище подвійної концентрації, 1 мл і по 1 мл у десятикратному розведенні засівають у 5 мл цього ж середовища звичайної концентрації. Витримують у термостаті протягом 24 годин за температури 37 °С, потім із усіх колб і пробірок, в яких спостерігається зростання бактерій (помутніння, зміна кольору середовища з синього на зелений або жовтий), роблять висів на сектор в чашки Петрі з молочно-інгібіторним середовищем. Пробірки з посівами в лужно-поліміксинове середовище, в яких ще немає ознак зростання, залишають на добу в термостаті, і якщо в якихось пробірках з'явилось зростання, то також роблять висів на молочно-інгібіторне середовище. Після 24 год інкубування в термостаті враховують колонії

аспидно-чорні, опуклі, з металевим блиском (*S. faecalis*), а також колонії, оточені вузькою зоною просвітління з випаданням по периферії осаду параказеїну (*S. faecium*, біовар *liquefaciens*), дрібні сірі колонії (*S. faecium*, біовар *durans*). Із частини колоній (вибірково) слід приготувати мазки, забарвити за Грамом. Наявність ентерококів дає можливість дати заключну відповідь. Індекс ентерококів визначають за табл. 4.4.

Під час визначення ентерококів методом прямого посіву (в основному при дослідженні стічних вод) роблять посіви досліджуваної води безпосередньо на чашки Петрі із середовищем сланець або жовчним середовищем у 2 або 5 повторностях. Зазвичай беруть 1 мл, 0,5, 0,2 і 0,1 мл з кожного десятикратного розведення. Засівають воду, ретельно втираючи шпателем у поверхню живильного середовища до повного вбирання води. Ідентифікація та підрахунок ентерококів проводяться так само, як під час визначення титраційним методом.

Визначення спорових сульфїтредукуючих клостридій

Сульфїтредукуючі клостридії (представник цієї групи мікроорганізмів – *Clostridium perfringens*) – спороутворювальні анаеробні паличкоподібні мікроорганізми, редукуючі сульфїт натрію на залізо-сульфїтному агарі за температури 44 °С протягом 16–18 год. Метод заснований на вирощуванні посівів у залізо-сульфїтному агарі в умовах, наближених до анаеробних, і підрахунку числа чорних колоній.

Кількісно ці мікроорганізми у воді можна визначити методом мембранної фільтрації або прямим посівом. В якості поживного середовища для виділення та підрахунку сульфїтредукуючих клостридій зазвичай використовують середовище Вільсона-Блера (залізосульфїтний агар).

Перед посівом пробу води прогрівають на водяній бані за температури (75 ± 5) °С протягом 15 хв. для виключення вегетативних форм. Досліджувану хлоровану воду можна не прогрівати. Застосовуючи метод мембранної фільтрації, пробу води певного обсягу пропускають через фільтр, який потім поміщається в пробірку з підготовленим розплавленим живильним середовищем верхньою стороною всередину (пробірка з живильним середовищем після посіву повинна бути негайно охолоджена у холодній воді, щоб уникнути попадання повітря) або у чашку Петрі на поверхню живильного середовища, яка потім заливається товстим шаром того ж живильного середовища.

Метод прямого посіву передбачає посів у стерильні пробірки 20 мл води таким чином: по 10 мл у 2 пробірки (обсягом не менше 30 мл), або по 5 мл у 4 пробірки (обсягом не менше 15 мл).

Зверху посіви води заливають гарячим (75–80 °С) залізосульфїтним агаром у кількості, що перевищує обсяг води в 2 рази. Середовище заливають по стінці пробірки, намагаючись не допустити утворення бульбашок повітря. Пробірки з посівами швидко охолоджують у склянці з холодною водою, інкубують за 44 °С протягом 24 год.

Кількісному обліку підлягають тільки ті посіви, де отримані ізольовані колонії. Підраховують чорні колонії, що вирости як на фільтрі, так і в товщі живильного середовища. Результат аналізу виражають числом колонієутворювальних одиниць (КУО) спор сульфїтредукуючих клостридій у певному обсязі води (підданої аналізу).

Визначення бактеріофагів

Присутність бактеріофагів у воді свідчить про фекальне забруднення і є індикатором або сигналом можливої присутності ентеровірусів. Тому методи визначення бактеріофагів (в т. ч. і коліфагів) включені в методичні вказівки МОЗ України та регламентовані Міжнародними стандартами (ISO 10705-1: 1995; 10705-2: 2000; 10705-3; 10705-4).

Існує кілька методів кількісного і якісного визначення бактеріофагів в воді.

Всі методи засновані на чутливості музейних культур мікроорганізмів і припускають використання таких тест-організмів (за міжнародними стандартами): мутант *Salmonella typhimurium*, непатогенний для людини; штам *Escherichia coli* K-12 Hfr з відповідної колекції культур ATCC 23631 або NTCT12486; штам *E. coli* роду CN, званий WG5; а також бактеріофаги MS2, NCTC12487 або ATCC 15597 для контролю чутливості тест-організмів.

Міжнародним стандартом регламентуються методи визначення бактріофагов РНК типу F і соматичних бактріофагов, які дозволяють визначити присутність / відсутність бактеріофагів, а також дати їх кількісну оцінку (ISO 10705-1).

Бактеріофаги РНК типу F – це бактеріальні віруси, здатні інфікувати певний штам господаря за допомогою F-фімбрій або статевих фімбрій. Соматичні бактеріофаги є непатогенними для людини, проте стійкими до зовнішніх чинників, особливо до висушування.

Прямий метод виявлення бактеріофагів

Цей метод застосовується під час визначення досліджень за епідпоказаннями або в разі необхідності отримання результатів у короткі терміни.

Хід визначення. За 18–24 години перед проведенням аналізу необхідно зробити посів тест-культури *E. coli* K12 F + (Рос. гос. ін-т мед. біол. препаратів ім. Л. А. Тарасевича) на скло з поживним агаром (МПА). Перед проведенням аналізу зробити змив зі скла 5 мл стерильної водопровідної води і за стандартом мутності приготувати суспензію тест-організму в концентрації 10⁹ бакт. клітин/мл.

Розплавити й остудити до 45 °С 2 %-й живильний агар. Досліджувану воду 100 мл внести в 5 стерильних чашок Петрі (по 20 мл в кожную). У живильне середовище додати змив *E. coli* (з розрахунку 1,5 мл на 150 мл агару) і добре перемішати. Отриманою сумішшю залити по 30 мл спочатку порожню чашку Петрі (контроль), а потім все чашки, що містять

досліджувану воду. Вміст чашок перемішують обертальними рухами. Після застигання живильного середовища чашки перевертають догори дном і ставлять для інкубації в термостат за 37 °С на 18–24 год.

Облік результатів проводять шляхом підрахунку і підсумовування бляшок, які вирости на 5-ти чашках Петрі. Результати виражають у бляшкоутворювальних одиницях (БОЮ) на 100 мл води.

У контрольній пробі бляшки мають бути відсутні.

Санітарно-мікробіологічна оцінка води

Оцінка якості води проводиться комплексно: за санітарно-мікробіологічними показниками з урахуванням органолептичних, гельмінтологічних і хімічних даних і регламентується відповідними ГОСТами, Санітарними правилами і методичними вказівками. Безумовним показником забрудненості води є виявлення патогенних мікроорганізмів. У цьому випадку вода вважається непридатною для будь-яких цілей.

Критерії оцінки якості води розроблені диференційно залежно від категорії води і її призначення та представлені в додатку В.

Під час оцінювання питної води керуються основною вимогою: вона не повинна містити патогенні бактерії і віруси. При санітарно-бактеріологічній оцінці води колодязів виходять з того, щоб у 1 л БГКП містилося не більше 10. Показником фекального забруднення води криниць є виявлення ентерококів. Відсутність знезараження колодязної води, можливість біологічної контамінації (опаді, просочування забруднених зливових і ґрунтових вод тощо) роблять її епідемічно небезпечною, і тому потрібен постійний контроль. У разі виявлення у воді ентерококів вона вважається непридатною до вживання, і колодязь підлягає очищенню.

Якщо під час вибору нового джерела водокористування колі-індекс води водойми перевищує 100 00 в 1 л, то проводиться додаткове дослідження на присутність *E. coli* і ентерококів як показників свіжого фекального забруднення і безпосереднє виявлення патогенних бактерій – сальмонел і шигел.

За індексом *E. coli*, ентерококів більше 1 000 в 1 л води водойми розцінюється як забруднена, причому контамінація вважається свіжою, а вода – небезпечною в епідемічному відношенні. В останні роки розроблено та запропоновано [Л. В. Григор'єва, 1975] додаткові критерії оцінки санітарного стану водойм, в які включені показники титру ентерококів, перфрингенс-титр і індекс бактеріофагів.

4.2 Експериментальна частина

Порядок виконання роботи:

1. Провести посів проб води методом бродильних проб для визначення показників.

2. Зробити пересів з середовища ГПС (Кесслер) на диференційно-діагностичне середовище Ендо.
3. Провести біохімічні тести колоній, що вирости на середовищі Ендо.
4. Визначити кількісні показники санітарного стану води (індекс ОКБ, ТКБ, сульфїтредукуючих клостридій, загальну забрудненість).
5. Дати оцінку санітарного стану водного об'єкта, звідки була взята проба води. Можливість використання води для пиття.

Контрольні питання

1. Якими факторами визначаються кількісний і якісний склад мікрофлори води?
2. Який обсяг води відбирається для санітарно-мікробіологічних досліджень? Розглянути всі випадки.
3. Які види мікроорганізмів визначаються у питної води як санітарно-показова мікрофлора?
4. Як регламентується час між відбором проб і початком мікробіологічних досліджень нормативно-технічними документами?
5. За якої температури транспортують відібрані проби води? Чому?
6. У яких випадках у воді визначаються патогенні мікроорганізми (які)? Які методи для цього застосовують?
7. На яких властивостях мікроорганізмів засновані прискорені методи визначення патогенних мікроорганізмів? У чому полягають їх недоліки?
8. Які біохімічні ознаки повинен мати виділений мікроорганізм, щоб його можна було віднести до *E. coli*? Якими показниками відрізняються *E. coli* від ЛКП?
9. У яких випадках для визначення кількості сапрофітних мікроорганізмів може використовуватися прямий метод? У чому він полягає?
10. Поясніть мету роздільного визначення кількості мезофільних і термофільних сапрофітів у воді.

Лабораторна робота № 5 ІНДИКАТОРНІ МІКРООРГАНІЗМИ

Мета роботи: познайомитися з методами виявлення, визначення й обліку найпростіших (Protozoa) у природних водоймах.

5.1 Теоретичні відомості

Оцінка якості води у водоймі проводиться на підставі результатів фізико-хімічного, бактеріологічного й біологічного аналізів. Кожен із

перелічених видів аналізу має свої переваги і недоліки, вони не замінюють один одного, і найбільш вірогідна оцінка виходить за умови поєднання всіх трьох методів.

Фізико-хімічні дослідження дозволяють оцінити величину і характер забруднення, його вплив на зміну якості води. Бактеріологічний аналіз дає можливість визначити ймовірність знаходження у воді патогенних мікроорганізмів. Біологічний аналіз сприяє встановленню ступеня забруднення водойми в цілому. У деяких випадках він допомагає зафіксувати наслідки короточасного забруднення водойми, яке не може бути зареєстровано методами фізико-хімічного та бактеріологічного дослідження.

Біологічний аналіз води заснований на обов'язковій присутності деяких організмів у воді із певним ступенем забруднення.

Для біологічної індикації якості природних водойм необхідно познайомитися з будовою і принципами систематики найпростіших.

Протягом приблизно 80 % всього періоду органічної еволюції, яка відбувається на Землі, наша планета була населена виключно мікроорганізмами й найпростішими. Вони існували, коли планета тільки набувала свого нинішнього вигляду, коли зсувалися і розходилися континенти, а земна кора багато разів опускалася і стискала в складки. За активної участі мікроорганізмів і ґрунтових найпростіших виникали поклади руд, вугілля, родовища нафти і природного газу (Шлегель, 1987).

Підцарство найпростіших (*Protozoa*: грец. *Protos* перший, *zoon* тварина) налічує, приблизно, 50000 видів. Найпростіші, що живуть у океанах, прісних водах, ґрунті і у вищих організмах, займають найважливіше місце в кругообігу речовин у біосфері. У водному середовищі найпростіші – основа планктону, використовуваного в їжу іншими більшими тваринами. Із скелетів найпростіших: форамініфер, радіолярій і панцирних джгутиконосців – утворюються потужні пласти осадових порід.

Багато водних найпростіших – седіментатори, що харчуються зваженими органічними частинками і бактеріями, відіграють істотну роль у біологічному очищенні вод. У прісних водах мешкають представники типів: саркодових – *Sarcodina*, джгутикових – *Mastigophora* і інфузорій – *Ciliophora* (рис. 5.1).

Ґрунтові амеби, інфузорії і джгутиконосці – важлива ланка ґрунтової фауни: вони беруть участь у ґрунтоутворенні. Низка видів найпростіших складає корисну групу симбіонтів вищих тварин, що поліпшують травлення й обмінні процеси в організмі. Наприклад, маловійкові інфузорії в рубці у жуйних, а джгутикові в кишечнику термітів допомагають господареві перетравлювати клітковину.

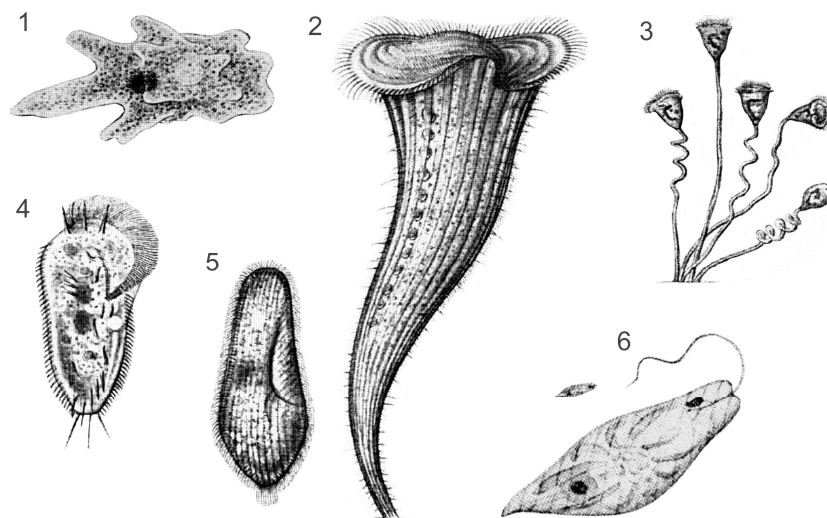


Рисунок 5.1 – Представники найпростіших (Protozoa):

- 1 – амеба протеус (*Amoeba proteus*); 2 – блакитний трубач (*Stentor coeruleus*);
 3 – вортіцелла мікростомата – сувойка (*Vorticella microstomata*);
 4 – стилоніхія мітілус (*Stylonychia mytilus*); 5 – інфузорія-туфелька (*Paramecium caudatum*); 6 – Евглена зелена (*Euglena viridis*)

Паразитичні прості в природі представляють важливий фактор природного відбору, який регулює чисельність інших видів тварин і рослин. Проте людині найпростіші можуть приносити не тільки користь, але й велику шкоду. В організмі людини паразитує близько 30 видів найпростіших. Деякі з них викликають небезпечні протозойні захворювання: амебіаз, тріпаносомози, лейшманіози, лямбліоз, трихомоніаз, малярію, токсоплазмоз та ін.

До простіших належать організми, тіло яких складається з цитоплазми і одного або декількох ядер. Цитоплазма в тілі найпростіших утворює одну клітину, тому їх називають одноклітинними.

Клітина найпростішого – самостійна особина, яка виконує всі функції цілісного організму, тому найпростіші є зручними об'єктами для різноманітних біохімічних досліджень: на них можна вивчати як клітинні, так і реакції організму на токсичний вплив.

Переважає більшість найпростіших має мікроскопічні розміри, що коливаються в межах від 3 до 150 мкм.

Частини тіла найпростішого, що виконують різні функції, називають органелами, або органоїдами. Є органели двох типів: загального значення, характерні для будь-яких клітин (мітохондрії, центросоми, рибосоми та ін.), і спеціального значення, що виконують життєві функції одноклітинних як самостійних організмів (рис. 5.2).

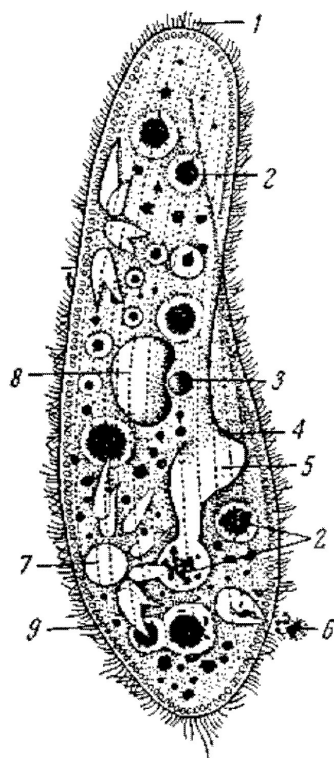


Рисунок 5.2 – Будова інфузорії-туфельки:

1 – війки; 2 – травні вакуолі; 3 – мікронуклеус; 4 – клітинний рот; 5 – клітинна глотка; 6 – порошниця в момент викидання непережарених залишків їжі; 7 – скорочувальна вакуола (центральный резервуар і радіально розташовані призводять канали); 8 – макронуклеус; 9 – трихоцисти

Органідами руху в різних представників типу можуть бути ложноножки (псевдоподії), джгутики, війки (рис. 5.1). Війки можуть зливатися, утворюючи мембрани і щільні негнучкі щетинки – цирри (рис. 5.1 (4)). Повзання чи хода поширені серед інфузорій, що мають цирри, на яких тварина пересувається, як на ходулях. Кількість і розташування цирр є діагностичною ознакою.

Деяким високоорганізованим найпростішим (інфузоріям) властива ще одна форма руху – скорочення. Тіло таких найпростіших здатне швидко змінювати свою форму, а потім знову повертатися до вихідного стану. Здатність до швидкого скорочення обумовлена наявністю в тілі найпростіших особливих волоконце – міон утворень, аналогічних м'язам багатоклітинних тварин. Скорочувальний рух властивий переважно інфузоріям, що ведуть прикріплений спосіб життя: скорочується тіло, або стеблинка, на якій розташовується тварина.

Зовнішня поверхня цитоплазми найпростіших – щільна еластична мембрана (оболонка) називається *пелікулою*. Ті найпростіші, у яких ця оболонка нерозрізнена, називаються голими (див. амеби, рис. 5.1). Пелікула складається переважно із жироподібних речовин і має властивість напівпроникної мембрани. Пелікула може бути гладкою, але може мати і

складну будову. Багато найпростіших мають зовнішній скелет у вигляді раковини.

Органи травлення в більшості найпростіших складаються, перш за все, із травних вакуолей. У високоорганізованих представників найпростіших (інфузорії) органи травлення починаються клітинним ротом 4, продовжуються в клітинну глотку 5, від якої беруть свій початок травні вакуолі 2 і закінчуються порошицею 6 – отвір в пелікулі, через який викидаються неперетравлені залишки їжі.

Харчування відбувається різними шляхами. Деякі заковтують їжу шляхом фагоцитозу (голозойний тип харчування). Іноді органічні речовини всмоктуються осмотично. У деяких із найпростіших є хлорофіл, і певною мірою вони здатні до автотрофного типу харчування шляхом фотосинтезу.

Найпростіші харчуються головним чином бактеріями і дрібними зв'язаними речовинами. Завдяки цьому вони грають важливу роль у процесах освітлення води.

Як правило, в тілі найпростіших є скоротливі (пульсуючі) вакуолі 7, які відіграють роль органоїдів осморегуляції, виділення й дихання. Особливо добре розвинені скоротливі вакуолі у прісноводних найпростіших.

Ядерний апарат найпростіших дуже різноманітний. Усі тварини мають добре виражене ядро, відокремлене від цитоплазми ядерною мембраною. Форма ядра буває округлою, овальною, подковоподібною і тощо. У інфузорій є два ядра. Найбільш велике, зване макронуклеус 8, бере участь у виконанні функцій харчування, обміну, зростання і різних фізіологічних реакцій. Менше ядро – мікронуклеус – бере участь у процесі статевого розмноження. У найпростіших, що мають одне ядро, воно виконує обидві функції.

Безстатеве розмноження найпростіших здійснюється шляхом ділення клітини, причому джгутиковим властиве поздовжнє ділення, а війковим інфузоріям – поперечне. Організми, які не мають осрової симетрії, наприклад, амеби, діляться в будь-якому напрямку.

Статеве розмноження найпростіших здійснюється різними шляхами: у одних форм зливаються клітини, у інших – ядра всередині однієї і тієї ж клітини, у третіх відбувається обмін ядерною речовиною.

Органи нападу і захисту представлені трихоцистами 9. Вони розташовані в протоплазмі перпендикулярно поверхні тіла під самою пелікулою. Трихоцисти вистрілюються і потім замінюються новими.

Багато найпростіших у несприятливих умовах утворюють *цисти*, тобто стають нерухомими, приймають округлу форму, перестають харчуватися (процеси обміну речовин сповільнюються), зовні покриваються щільною оболонкою, що захищає їх від висихання, несприятливої температури, впливу шкідливих речовин. У інцистированому стані найпростіші легко розселяються. У разі попадання цист у сприятливі умови відбувається ексцистування та перетворення на вегетативну форму, здатну до пересування, харчування тощо.

Найпростіші, незважаючи на свої мікроскопічні розміри, виконують глобальну роль у функціонуванні сучасної біосфери. Світ найпростіших бере участь у різних геохімічних процесах і біологічному кругообігу основних життєво важливих елементів – вуглецю, азоту, фосфору і сірки. Найпростіші беруть участь у самоочищенні природних вод і ґрунтів, їх використовують для біологічного очищення стічних вод. Вони є індикаторами забруднення води і ґрунтів. Найбільше значення в біоіндикації і біотестуванні мають інфузорії.

Класифікація інфузорій базується на структурі війкового апарату всього тіла, в тому числі й навколоротового. Інфузорії поділяються на два класи: війкові (Ciliata) і сисні (Suctoria).

Представники війкових інфузорій мають війки протягом усіх фаз розвитку, а інфузорії, що смокчуть, позбавлені війок на більшій частині життєвого циклу.

Клас війкових – центральний, найбільш численний клас інфузорій, який включає 3 підкласи і близько 20 рядів.

1. Підклас Рівновійчасті інфузорії (HOLOTRICHA) – тіло рівномірно покрите війками однакової довжини. Біля рота, як правило, мембранел немає.

1. Ряд Простоматиду (Prostomatida) – тіло інфузорій покрите товстим панциром, що складається з багатьох рядів пластинок.

Колепс гіртус (Coleps hirtus) – дрібні клітини, діжкоподібної форми бурого кольору. Тіло вкрите численними невеликими пластинками, що створюють ефект панцира. Довжина тіла 20–25 мкм, ширина 10–15 мкм. На передньому полюсі клітини ледь помітні зубчики, що прикривають клітинний рот. На задній частині тіла добре видна одна каудальна війка, яка в кілька разів довша за інші. Скорочувальна вакуоль одна, знаходиться на задньому кінці тіла. Макронуклеус округлий, одиночний, розташований центрально. Мешканець альфа-мезосапробної і полісапробної зон водойм (дод. А, фото 1).

2. Ряд Гімностоматиду (Gymnostomatida) характеризується розташуванням рота на передньому кінці клітини або збоку. Це переважно хижі інфузорії. У багатьох із них добре розвинений паличковий апарат у цитоплазмі біля рота, який сприяє прориву клітини жертви.

Представник цього ряду – інфузорія **Ділептус Ансер (Dileptus anser)** з щупальцевим відростком на передньому кінці і з бічним положенням рота. *Dileptus anser* – великі інфузорії: довжина тіла 70–90 мкм, ширина 14–20 мкм. Передній кінець тіла витягнутий у вигляді хоботка, довжина якого трохи менше половини загальної довжини тіла. Каудальна частина клітини не утворює шиповатого виросту. Макронуклеус одиночний, чіткий, розташовується в середині тіла. Скорочувальна вакуоль одна, знаходиться в задній частині клітини. Інфузорії заганняють їжу в рот за допомогою довгого переднього відростка. Живуть у водоймах середньої забрудненості (дод. А, фото 2).

Спатидіум поркулюс (Spathidium porculus) – великі інфузорії, довжина тіла 100–120 мкм. Форма клітин лілеєподібна. Клітинний рот розташований у передній частині, широкий, із боків великі війки. Макронуклеус ковбасоподібний, розташований у центрі тіла. Скорочувальна вакуоль знаходиться в каудальній частині тіла. Інфузорії пересуваються повільно. Живуть зазвичай у забруднених водоймах (дод. А, фото 3).

3. Ряд Кольподіду (Colpodida) – клітини від дрібних розмірів до великих. Клітинний рот розташовується посередині черевного боку, обрамлений довгими віями. Передня частина тіла утворює кіль.

Кольпода кукулус (Colpoda cucullus) – мають добре виражену бобовоподібну форму тіла: опуклий спинний бік, а на черевному є глибоке напівкругле поглиблення, на дні якого знаходиться клітинний рот. Забарвлення інфузорій темне: від коричневого до чорного. Цитоплазма забита травними вакуолями. Війки рівномірно покривають тіло, утворюючи 18–20 рядів. Макронуклеус округлий, розташований у серединній частині тіла. Скорочувальна вакуоль знаходиться на задньому кінці тіла. Зустрічається у водоймах альфа-мезосапробних і полісапробних (дод. А, фото 4).

Кольпода мапازی (Colpoda maupasi) – клітини широкоовальні, темного кольору. Довжина 35–70 мкм, ширина 20–40 мкм. На передньому кінці тіла є кіль з добре помітними 6–7 зубчиками. Довжина кіля становить 1/3 від довжини тіла. Задній кінець тіла клітини широко закруглений. Макронуклеус округлий, зміщений до спинної сторони. Скорочувальна вакуоль розташована на задньому кінці тіла. Інфузорії живуть у мезосапробних водоймах (дод. А, фото 5).

Кольпода штейні (Colpoda steini) – дрібні інфузорії, довжина коливається в межах 20–35 мкм, ширина 15–30 мкм. Форма тіла односторонньо опукла, причому опуклою є спинна сторона, а черевна – майже плоска. У серединній частині черевної сторони в невеликому поглибленні розташовується клітинний рот, оточений довгими війками, що утворюють «бороду». На передньому кінці 6–7 ясно виражених ребер. Макронуклеус овальний, розташовується ближче до спинної сторони. Скорочувальна вакуоль одна, знаходиться на задньому кінці тіла. Мешкає в альфа-мезосапробних водоймах (дод. А, фото 6).

Кольпода аспера (Colpoda aspera) – клітини овальної форми, трохи стислі з боків, цитоплазма світла. Довжина клітин 30–50 мкм, ширина 15–25 мкм. Війкових рядів 14–16. Передній кіль із 5 зубчиками. Клітинний рот розташований ближче до середини тіла, оточений довшими війками. Макронуклеус округлої форми, розташовується ближче до спинної сторони. Скоротлива вакуоля знаходиться в задній частині клітини. Мешканець мезосапробних водойм (дод. А, фото 7).

4. Ряд Гіменостоматіду (Hymenostomatida) – найбільш численний за кількістю видів. Більшість видів ряду вільно живуть, наприклад, інфузорія-

туфелька (*Paramecium caudatum*). Для цього ряду характерна наявність ротової лійки – перистоми, яка оточена з одного боку довгою мембраною, навпроти якої на іншій стороні розташовані три мембранели. Інфузорії харчуються, як правило, бактеріями.

Інфузорія-туфелька (*Paramecium caudatum*) – великі інфузорії, довжина тіла коливається в межах 180–280 мкм. Форма тіла овальна, витягнута в довжину, нагадує туфельку. Найбільш широка в задній третині. Задній кінець загострений і має довші війки, ніж решта тіла. На одному боці тіла (черевному) всередину вдається глибокий жолоб, що веде в глотку. Все тіло інфузорії вкрите війками, їх приблизно 15 тисяч. Ядерний апарат складається з ниркоподібного макронуклеуса і одного, досить великого мікронуклеуса. Інфузорії-туфельки мешкають у мезосапробних водоймах (дод. А, фото 8).

Кольпідіум кольпода (*Colpidium colpoda*) – дрібні інфузорії, довжина тіла коливається в межах 70–90 мкм, ширина – 35–50 мкм. Форма тіла нагадує боб: вентральний бік увігнутий, дорсальний опуклий. Ротовий отвір трикутної форми, обрамлений рядами війок. Війковий покрив густий і рівномірний, рядів багато. Макронуклеус округлий, розташований у середині тіла. Скорочувальна вакуоль знаходиться на задньому кінці тіла. Інфузорії живуть у мезосапробних водоймах (дод. А, фото 9).

Уронема Марінум (*Uronema marinum*) – дрібні інфузорії, довжина тіла коливається в межах 18–30 мкм, ширина – 7–12 мкм. Форма тіла подовжено-овальна, задня частина трохи розширена. Війковий покрив мало помітний. На задньому кінці тіла є довга каудальна щетина. Ротовий отвір знаходиться в передній частині тіла. Макронуклеус округлий, знаходиться посередині тіла. Скорочувальна вакуоль розміщується в нижній частині тіла. Мешканець середньо забруднених водойм (дод. А, фото 10).

II. Підклас Кругловієкові інфузорії (*PERITRICA*) – війки розташовуються тільки навколо ротової лійки, утворюючи лівозакручену спіраль. Більшість видів ведуть прикріпленний спосіб життя.

Типовий представник – **Вортицелла мікростомата (*Vorticella microstomata*)**, дрібні інфузорії, довжина тіла коливається в межах 30–35 мкм, ширина 25–28 мкм. Форма тіла бокалоподібна, рівномірно звужується догори. Від основи клітини відходить стеблинка, в якій проходить пучок Міон. За допомогою стеблинки інфузорія прикріплюється до субстрату. За різкого скручування стеблинки сувойка миттєво рятуються від небезпеки. Деякі перітріхіди живуть у будиночках, інші утворюють колонії (*Zoothamnium*), що мають вигляд пальми. Розмножуються сувойкі брунькуванням. При цьому утворюється форма, що вільно плаває – «бродяжка». Надалі при осіданні на дно у неї утворюється стеблинка. Стебелина перевищує розміри клітин у 3–4 рази. Рот оточений віночком довгих війок, від нього відходить конусоподібна глотка. Макронуклеус

великий, 3-подібнозігнутий, лежить поперек тіла. Мешканець полісапробної зони (дод. А, фото 11).

III. Підклас Спіральнівійкові (SPIRITRICHA) – у представників цього підкласу відсутній війчатий апарат. Ротові війки сильно розвинені.

1. Ряд Оліготріхиди (Oligotrichidae) – війки здебільшого зникли у них повністю, збереглися лише короткі ряди окремих щетинок або дуже мало війок.

Стромбідіум віріді (Strombidium viride) – дрібні інфузорії, довжина тіла коливається в межах 34–50 мкм, ширина – 27–41 мкм. Форма тіла ближче до кулястої: передня частина широкозакруглена, задня трохи витягнута. Війковий покрив відсутній. Рот знаходиться на апікальному полюсі, оточений віночком потужних мембранел. Макронуклеус овальної форми, лежить на екваторі клітини. Скорочувальна вакуоль розташована на апікальній частині клітини. Мешканець мезосапробної зони (дод. А, фото 12).

2. Ряд Гіпотріхиди (Hypotrichida)

Уролептус нісціс (Uroleptus piscis) – великі інфузорії, довжина тіла коливається в межах 58–85 мкм, ширина 14–27 мкм. Тіло подовженої, овальної форми: задній край плавно закруглений, передній трохи звужений. На вентральному боці є 2 ряди цирр. Клітинний рот досягає 1/3 довжини тіла. Макронуклеус двучленистий, частини майже впритул прилягають одна до одної, знаходяться посередині клітини. Скорочувальних вакуолей теж дві: одна в каудальній частині, інша недалеко від клітинного рота. Мешкає у водоймах із сильним органічним забрудненням (дод. А, фото 13).

Оксітріха пеліонела (Oxytricha pellionella) – великі інфузорії, довжина тіла коливається в межах 50–50 мкм, ширина – 15–20 мкм. Форма тіла довгоовальна, рівномірно закруглена на обох кінцях. В області клітинного рота є 8 фронтальних цирр. На задньому кінці тіла – 5 дуже довгих цирр, що виходять за межі клітини. Тіло дуже гнучке. Клітинний рот займає 1/4 частину довжини тіла. Макронуклеус двохчленистий, розташований по осі тіла. Скорочувальна вакуоль розташована ближче до перистоми. Хороший показник високого ступеня органічного забруднення (дод. А, фото 14).

Стілоніхія мітілюс (Stylonichia mytilus) – великі інфузорії, довжина тіла коливається в межах 70–90 мкм, ширина 28–35 мкм. Форма тіла подовжено овальна, передня частина дещо розширена, задня звужена. Перистоми дуже великі, майже трикутної форми, складають 1/3 довжини тіла. Тіло негнучке. Макронуклеуси два, бобоподібної форми, знаходяться у центральній частині клітини. Скорочувальна вакуоль знаходиться трохи нижче перистоми. Мешканець альфа-мезосапробної зони (дод. А, фото 15).

Аспідиска костата (Aspidisca costata) – дрібні інфузорії, довжина тіла коливається в межах 25–35 мкм, ширина – 20–30 мкм. Інфузорії плоскі, мають широку яйцеподібну форму тіла. В області перистоми розташовані 6 коротких цирр. Перистоми невеликі. Макронуклеус довгий, підковоподібний.

Скорочувальна вакуоль розташована в задній частині клітини. Показник середньої і вищої міри органічного забруднення (дод. А, фото 16).

5.2 Експериментальна частина

5.2.1 Методика приготування тимчасового препарату

1. Візьміть предметне скло, тримаючи його за бічні грані, і покладіть на стіл.
2. Очною піпеткою візьміть невелику кількість аналізованої води з природної водойми. Помістіть краплю води в центрі предметного скла.
3. Для уповільнення руху найпростіших необхідно в краплю води додати краплю розчину желатину.
4. Для виявлення структур клітини необхідно в краплю води додати краплю розчину еозину.
5. Після цього візьміть покривне скло (обов'язково за бічні грані, інакше залишите відбитки пальців на поверхні скла) і опустіть одну з бічних граней покривного скла до краю аналізованої краплі, так щоб крапля розтеклася уздовж бічного краю.
6. Потім повільно опустити покривне скло на краплю води.
7. Помістіть препарат на предметний столик мікроскопа і почніть роботу.

Необхідним елементом мікроскопічного вивчення об'єкта є його зарисовування з метою краще зрозуміти і закріпити в пам'яті будову об'єкта, форму окремих структур, їх взаємне розташування.

Рисування на заняттях із мікробіології не самоціль, а спосіб вивчення об'єкта, при цьому слід дотримуватися низки правил.

1. Рисувати можна тільки на одній стороні аркуша, оскільки рисунки, зроблені на обох сторонах, накладаються один на одного і з часом псуються.
2. Рисунок повинен бути великим, деталі добре помітні. На одній сторінці не повинно бути більше 3-4 рисунків.
3. Головна вимога до рисунка – правильне відображення форми, співвідношення обсягу і розмірів (довжина, ширина та ін.) окремих частин і цілого. Щоб легше домогтися цього, спочатку нарисуйте загальний контур об'єкта, потім всередині його злегка намітьте контури інших деталей і після цього вимальовується їх чітко.
4. Правильне відображення співвідношення розмірів досліджуваного об'єкта дозволить виконати і друга вимога – показати індивідуальні особливості об'єкта, тобто зарисувати не абстрактну, а конкретну клітину.
5. Навколо рисунка не треба рисувати контури поля зору мікроскопа.
6. До кожного рисунка обов'язково повинні бути зроблені позначення його окремих частин. Позначення можна робити двома способами:
 - а) до окремих частин об'єкта ставлять стрілочки і проти кожної пишуть назву. Всі написи повинні бути розташовані паралельно один одному;

б) до окремих частин об'єкта ставлять стрілочки і проти кожної пишуть певну цифру, потім збоку від рисунка або під ним стовпчиком по вертикалі пишуть цифри, а проти цифр – назву.

7. Якщо робота виконана правильно, в кінці заняття її підписує викладач. Якщо робота не відповідає вимогам, її необхідно переробити.

Матеріали та обладнання: мікроскоп, бюкси з природною водою, предметне скло та покривне, піпетки, 0,1 % розчин желатину, вата, фото або рисунки організмів-індикаторів, 0,01 % розчин еозину.

Завдання

Визначити за описом і зарисувати представників інфузорій у рідині, отриманій від викладача.

Форма звітності

Предоставити зошит із рисунками і висновками.

Контрольні питання

1. Опишіть будову найпростіших.
2. Опишіть, як харчуються та розмножуються найпростіші.
3. Наведіть класифікацію інфузорій.
4. Опишіть методику приготування тимчасового препарату.

Лабораторна робота № 6 БІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОГО МУЛУ І БІОПЛІВКИ

Мета роботи: навчитися аналізувати стан активного мулу і біоплівки.

6.1 Теоретичні відомості

Активний мул і біоплівка є сформованим біоценозом. До його складу входять бактерії, найпростіші, черв'яки і деякі членистоногі. Головна роль у переробці органічних сполук належить бактеріям. Найпростіші з'їдають бактерії і тонкодисперсну суспензію, чим сприяють проясненню рідини. Інші представники біоценозу також беруть участь у проясненні рідини. Постійні спостереження за ходом біологічного очищення стічних вод показали, що склад активного мулу й біоплівки свідчить про якість роботи очисних споруд.

Аеробний активний мул являє собою темно-коричневі пластівці, розміром до декількох сотень мікрметрів (70 % – живі організми і близько 30 % – тверді частинки неорганічної природи).

Зооглей – симбіоз популяцій організмів, покритий загальною слизуватою оболонкою.

Муловий індекс (МІ) – це об'єм, який займає один грам активного мулу за 30 хвилин відстоювання у літровому циліндрі (оптимальне значення мулового індексу від 80 до 120 см³/г; діапазон припустимих значень – від 60 до 150 см³/г).

6. 1.1 Характеристика мікроорганізмів активного мулу

Бактерії. Морфологічні особливості представлені трьома основними формами: палички, коки і спіріли;

– *видовий склад* – належать переважно до родів *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Desulfotomaculum*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina* тощо. Широко представлені в активному мулі і бактерії родів *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Mycobacterium*;

– *функції* – провідна роль у процесах вилучення зі стічної рідини розчинених, колоїдних і великих органічних забруднень, адаптація біоценозу до нових умов, підтримання життєздатності активного мулу.

Водорості:

– *синьо-зелені* (різні види *Oscillatoria*) колоніальні й одноклітинні форми – часто викликають евтрофікацію (цвітіння) водойм;

– *зелені* водорості (*Spirogyra crassa*, *Cladophora crispata*, *Pediastrum borianum*, *Scenedesmus quadricauda*) – відіграють значну роль у процесах як цвітіння, так і самоочищення водойм;

– *діатомові водорості* (*Navicula*, *Diatoma vulgare*) клітинні стінки містять кремній – служать їжею для водяних тварин, за присутності великої кількості органічних речовин переходять до гетеротрофного типу живлення й безпосередньо беруть участь у мінералізації органічних сполук.

Гриби. Зустрічаються переважно цвілеві вищі гриби, такі як *Fusarium*, *Nematosporangium* тощо, іноді нижчі гриби (*Mucor*) і дріжджі.

Масовий розвиток грибів у біофільтрі ускладнює проходження рідини через нього, а в аеротенку викликає спухання активного мулу.

Найпростіші (Protozoa). Зустрічаються: саркодові (*Sarcodina*) джгутикові (*Mastigophora*), війчасті інфузорії (*Ciliata*), інфузорії, сисні (*Suctoria*) тощо.

Функції найпростіших: не беруть особистої участі у споживанні органічних речовин, але регулюють видовий і віковий склад мікроорганізмів в активному мулі, підтримуючи його на оптимальному рівні. Поглинаючи велику кількість бактерій, найпростіші сприяють виходу значної кількості

бактеріальних екзоферментів, які можуть концентруватися в слизовому шарі мулу і брати участь у деструкції забруднень.

Саркодові (*Sarcodina*). Найчастіше зустрічаються корененіжки (голі та мушлеві). Пересуваються за допомогою псевдоподій, живляться бактеріями, а також найпростішими. Виконують регуляторну та індикаторну функції. **Із голих корененіжок** до індикаторних організмів належать представники роду *Amoeba* і роду *Pelomyxa*.

Мушлеві корененіжки характеризуються наявністю будиночка, що складається тільки з органічної речовини або просоченого залізом, кремнієм, кальцієм. Із мушлевих амеб найчастіше зустрічаються *Arcella*, *Centropyxis* і *Pamphagus*.

Джгутикові (*Mastigophora*). Безбарвні дрібні одноклітинні організми, на відміну від голих амеб, мають тонку оболонку. Розміри більшості з них не перевищують 10–20 мкм. Живляться бактеріями і деякими розчиненими органічними речовинами. Розвиваються у великих кількостях лише в сильно забрудненій воді. В очисних спорудах масовий їх розвиток спостерігається у пусковий період.

Інфузорії (*Ciliata*). Мають найскладнішу будову з усіх найпростіших (мають оболонку і більш-менш постійну форму тіла; на передньому кінці розташований ротовий отвір). Характерна ознака організмів цього класу – наявність війок.

- Живляться переважно бактеріями, засвоюють також колоїдні та дрібнодисперсні органічні забруднення.

- Є індикаторами роботи очисних споруд (зміни концентрації органічних забруднень, рівня рН, розчиненого кисню, температури води)

Хробаки (*Vermes*). Зазвичай присутні щетинкові (*Oligochaeta* і *Polychaeta*), круглі (*Nematoda*) і коловертки (*Rotatoria*). Коловертки – це мікроскопічні багатоклітинні тварини довжиною від 0,04 мм до 2,5 мм. Тіло їх складається з трьох відділів: голови, тулуба, ноги, але в деяких коловерток провести цей розподіл неможливо.

- Коловертки дуже чутливі до зміни умов середовища, тому більшість з них можуть бути віднесені до індикаторних організмів. Масовий розвиток кожного з видів коловерток небажаний, тому що приводить до збідніння біоплівки на живильні речовини й обмежує розвиток інших видів мікроорганізмів.

- Малощетинкові хробаки (найчастіше *Aelosoma*). Це досить великий хробак, довжиною тіла від 0,1 мм до 4,5 мм (іноді до 10 мм), тіло його розділено на сегменти, між якими розташовуються щетинки. У тілі *Aelosoma* зазвичай добре помітні жовті крапельки жирових включень. Очі у вигляді досить великих червоних плям. Розвиваються в спорудах зі стійкою нітрифікацією.

– Круглі хробаки (*Nematoda*) мають кругле з загостреними кінцями тіло довжиною 5–10 мм, покрите щільною оболонкою (кутикулою). Надмірний розвиток круглих хробаків відбувається за порушень режиму аерації (наявність застійних зон у біофільтрі, нерівномірна аерація із зонами відкладень у аеротенку). Одиначні екземпляри зустрічаються і за нормальної роботи споруджень.

Водяні кліщі (*Hydracarina*). Дрібні тварини довжиною менше 1 см. Тіло кулястої чи яйцеподібної форми не розділено ні на відділи, ні на сегменти. На передньому кінці тіла – очі і дві пари ротових жвал. На черевному боці 6 пар кінцівок. Щупики витягнуті вперед у вигляді хоботка з ротовим отвором на кінці. Зустрічаються в значній кількості в біоплівці. Сприяють більш повній мінералізації органічних речовин (мінералізують рештки відмерлої біоплівки, живляться найпростішими). Розпушують плівку біофільтрів, охороняючи її від ущільнення. Забезпечують більш тісний контакт плівки зі стічною рідиною. Сприяють переміщенню й виносу плівки з тіла біофільтра, мінералізуючи її.

Найважливіші фактори, що впливають на розвиток і життєздатність активного мулу і якість біологічного очищення:

- температура;
- наявність поживних речовин;
- вміст розчиненого кисню у муловій суміші;
- значення рН;
- присутність токсинів.

6..2 Технологічні характеристики активного мулу

Технологічний режим експлуатації очисних споруд залежить від:

- оптимального співвідношення між концентрацією забруднень у воді, що надходить, і робочою дозою активного мулу (за зменшення дози мулу виникає ефект підвищення навантаження і зниження якості очищення, за збільшення ускладнюється ефективність відокремлення мулу від очищеної води у вторинних відстійниках);
- необхідного часу контакту забруднень з активним мулом;
- достатньої аеробності системи.

Реакції активного мулу на зміну умов середовища

Надлишкові навантаження органічними забрудненнями

- мала розмаїтість видів найпростіших за значної якісної переваги двох-трьох із них;
- зооглейні скупчення бактерій зникають, з'являється багато окремих бактеріальних клітин, як у період пуску споруд;

- іноді розвиваються в значних кількостях нитчасті бактерії *Cladothrix*, *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*;

- пластівці мулу пухкі, окремі з них з'єднані між собою нитчастими бактеріями.

Такий мул дуже погано осідає чи взагалі не осідає, а спливає на поверхню. Вода над мулом каламутна.

Недостатній рівень концентрації розчиненого кисню

- коловертки нерухомі у витягнутому відмираючому стані; з'являється багато дрібних жгутикових амєб, можуть у значній кількості розвиватися сисні інфузорії;

- серед інших інфузорій майже виняткове панування одержує *Paramecium caudatum*;

- пластівці мулу розпадаються, колір стає білястим, він погано осідає, вода над мулом каламутна за наявності застійних зон у аеротенках і вторинних відстійниках мул набуває темного кольору, у ньому розвиваються круглі хробаки *Nematoda*.

Вплив відхилень рН середовища від норми

- зміна структури активного мулу: пластівці мулу витягуються в тяжі, мул подрібнюється, забарвлення його змінюється на більш світлі тони;

- зміна властивостей мулу: осідає погано, МІ може підвищуватися до 200–500 см³/дм³;

- зміна складу мулу: значно скорочується кількість найпростіших, при сильному закисанні середовища вони зникають зовсім, можливий інтенсивний розвиток гриба *Fusarium* (рН нижче 6,5), що викликає спухання активного мулу, інтенсивний розвиток дріжджів (рН нижче 5), що приводить до зниження ефекту очищення стічних вод.

Надлишкові навантаження органічними забрудненнями

- мала розмаїтість видів найпростіших за значної якісної переваги двох-трьох з них;

- зооглейні скупчення бактерій зникають, з'являється багато окремих бактеріальних клітин, як у період пуску споруджень;

- іноді розвиваються в значних кількостях нитчасті бактерії *Cladothrix*, *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*;

- пластівці мулу пухкі, окремі пластівці з'єднані між собою нитчастими бактеріями.

Такий мул дуже погано осідає чи взагалі не осідає, а спливає на поверхню. Вода над мулом каламутна.

Скидання токсичних промислових стоків

- зменшення розмаїтості видів найпростіших (переважають один-два види), дрібні розміри найпростіших;

- нерухомий стан війок інфузорій;

- коловертки нерухомі, у стиснутому відмираючому стані;

– мул дрібний, забруднений включеннями промислових стоків, може мати кольорові частинки, осідає погано, вода над мулом каламутна.

Нестача поживних речовин

- дрібні розміри найпростіших і коловерток, мікроорганізми стають прозорими, травні вакуолі у них зникають;
- інфузорії і коловертки частково перетворюються на цисти;
- нестача фосфору веде до спухання активного мулу внаслідок розвитку нитчастих бактерій;
- зооглей і пластівці мулу прозорі, вода над мулом має дрібну суспензію, що не осідає.

Вік та доза активного мулу

Зменшення середнього віку активного мулу приводить до зростання ефективності очищення: «молодий» активний мул більш пухкий, він має пластівці меншого розміру, більш низький вміст найпростіших; здатність до осідання «молодого» активного мулу в системах вторинних відстійників гірша.

У міру старіння мулу, пластівці збільшуються в розмірі, краще сорбують забруднення, більше захищені полісахаридним гелем від токсикантів, краще відокремлюються від очищеної води під час відстоювання, проте у старіючому активному мулі знижується відносна чисельність активних живих клітин і, відповідно, сила окиснення забруднень, тобто скорочується швидкість розкладання субстрату.

Високонавантажені споруди працюють на неповне очищення з віком мулу не більш 2-3 доби.

Вік мулу більш 8 діб забезпечує глибоку мінералізацію органічних речовин із наступною нітрифікацією. У низьконавантажених діяльність мулу пов'язана з нітрифікацією і великим віком мулу (6–12 діб).

Чим складнішим є склад стічних вод, тим більший вік мулу потрібний для задовільного окиснення забруднюючих речовин. Так, для обробки стічних вод виробництва синтетичного каучуку необхідний вік мулу складає 20–30 діб, а полівінілового спирту – більш 50 діб.

У зимовий період, коли потужність біологічного окиснення знижується, аеротенкам необхідно працювати з більш високою дозою мулу. Так якщо в літній період доза мулу складала 1,2–1,5 г/дм³, то в зимовий її варто підтримувати в інтервалі від 1,6 до 2,0 г/дм³.

Якщо аеротенки працюють з регенераторами, то в них необхідно підтримувати дозу в 2-3 рази більшу, ніж у аеротенках для забезпечення глибокого доокиснення важкоокиснюваних сполук.

Навантаження на активний мул. Домогтися того чи іншого необхідного ступеня очищення води й мінералізації мулу можна шляхом зміни співвідношення кількостей забруднюючих речовин у стічній воді і працюючого в системі мулу. Величина навантаження на 1 г активного мулу за БСК різна для різних споруджень. Низькі навантаження – менше 150 мг на

1 г беззольної сухої речовини мулу; середні – 200–350 мг/г, високі – більш 400–900 мг/г.

За навантажень за БСК₅ 200–250 мг/г аеротенки працюють стабільно, забезпечуючи високу якість очищених стічних вод, за навантажень більш 400 мг/г робота споруд стає нестабільною (підвищується муловий індекс, погіршується якість очищених стічних вод), за навантажень 50–150 мг/г відбувається повна нітрифікація азоту амонійних солей до нітритів.

Розглянемо характеристику активного мулу в різних умовах, рис 6.1, 6.2.

Мул, що працює задовільно

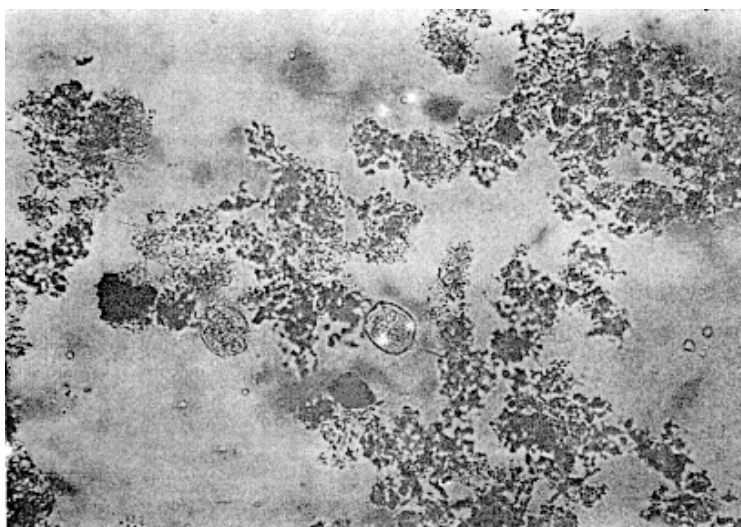


Рисунок 6.1 – Активний мул, що працює задовільно.

Помітні Euplotes

У мулі, що задовільно працює, знаходяться різні найпростіші з деякою перевагою одного з видів. Іноді зустрічаються *Lionotus*, *Podophrya*, *Vorticella microstoma*, джгутикові і дрібні амеби. Постійно присутні черевовійкові та коловійкові інфузорії. Бактерії – переважно в зооглейних скупченнях. Всі організми рухливі, у жвавому стані. Пластівці мулу компактні. Мул швидко осідає, вода над ним прозора.

Голодуючий мул

У разі низької концентрації органічних речовин у стічній рідині активний мул відчуває «голодування». При цьому найпростіші поступово дрібніють, вони стають прозорими, їх харчові вакуолі зникають, інфузорії перетворюються на цисти. Коловертки утворюють цисти пізніше, ніж інфузорії. Сірка в клітинах нитчастих сіркобактерій зникає. Зооглей і пластівці мулу стають прозорими. Вода над мулом каламутна.

Нітрифікуючий мул

У разі нестачі органічного харчування і надлишку мінерального азоту, в рідині, яка очищується, може утворюватися значна кількість нітритів і

нітратів. При цьому у воді у помітній кількості коловертки (*Callidina*, *Rotatoria* та інші); переважають *Peritricha* (*V.convallaria*, *Carchesium*), *Arcella*, великі амеби, буйно розвиваються *Zoogloea ramigera*. Можлива присутність у великій кількості малоцетинкових хробаків *Aelosoma*. Відсутні *Chilodon*, дрібні амеби, безбарвні джгутикові. Пластівці мулу пухкі, після осідання спливають.

Перевантажений мул

Мул містять механічні включення. Коловертки стискаються. Вортіцела має замкнутий війковий диск. У тому випадку, коли активний мул не справляється із забрудненням, що надходить, для біоценозу мулу характерна мала різноманітність видів за чисельної переваги двох-трьох із них.

Зазвичай спостерігається велика кількість безбарвних джгутикових, дрібних амеб, *Lionotus* або дрібних інфузорій. Іноді в помітній кількості присутні *Podophrya*, *Chilodon*, *Nematodes*, *V.microstoma*, *Opercularia* і нитчасті бактерії. Іл забруднений різними вкрапленнями: органічними аморфними частинками, сміттям. Пластівці мулу темні, густі. Вода над мулом із опалесценцією.

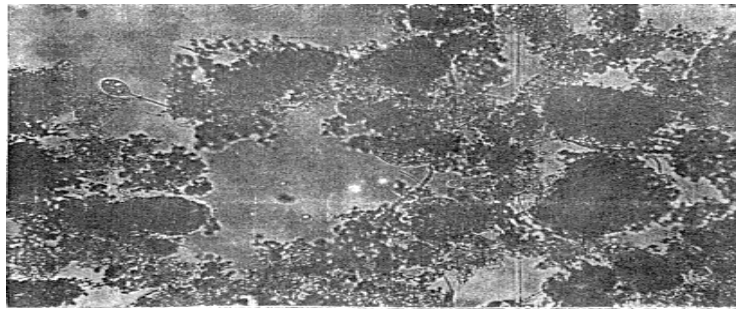


Рисунок 6.2 – Активний мул за значного перевантаження

Мул за зміни складу стічної води

Спостерігається збільшення кількості джгутикових; перетворення найпростіших на цисти; загибель коловерток у стислому стані; зменшується кількість нитчастих, які в подальшому можуть знову з'являтися.

Мул неадаптований

Зменшується кількість видів, один-два мають перевагу. Гідробіонти дрібнішають, особливо *Vorticella convallaria*, *Opercularia*, *Carchesium*. Загальна кількість зростає, або значно зменшується залежно від ступеня токсичності води. Війки інфузорій нерухомі, війковий диск оперкулярій замкнутий. Мул подрібнений, забруднений вкрапленнями промислових стоків, має пофарбовані частинки, погано осідає. Вода над мулом каламутна.

Мул за нестачі кисню

У разі нестачі кисню вортіцели відриваються від стебла й утворюють особливу форму, що вільно плаває, з вінцем війок на задньому кінці. За подальшого зниження концентрації кисню з'являються особини вортіцел,

роздуті до круглої форми, які потім лопаються. *Opercularia* із замкнутим війковим диском, дрібні, нерухомі. Коловертки – задубілі у витягнутому стані або відмирають. У великій кількості з'являються джгутикові; з інфузорій переважають *Paramecium caudatum*, тому що вони більш стійкі до нестачі кисню і здатні розвиватися навіть у мулі, що гние, його пластівці при цьому розпадаються. Вода над мулом стає каламутною.

Мул, що спухає

Масовий розвиток нитчастих бактерій і грибів витісняє зооглейні скупчення, що призводить до поганого осідання активного мулу й виносу його з вторинного відстійника. Очищення при цьому погіршується. Незважаючи на те, що нитчасті бактерії і гриби є гарними мінералізаторами, побічні явища, викликані їх масовим розвитком, знижують ефект очищення.

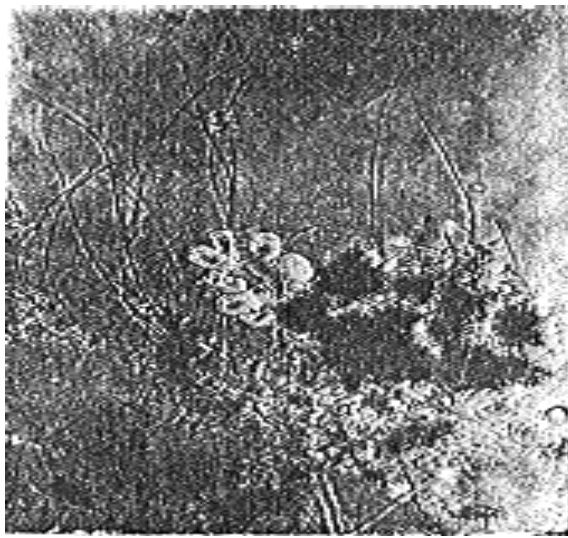


Рисунок 6.3 – Активний мул, що спухає

Мул із регенератора

За умови задовільної регенерації спостерігається кількісна перевага *Peritricha* (*Carchesium*, *Vorticella convallaria*, *Opercularia*) перед інфузоріями, що вільно плавають. Збільшення кількості організмів *Peritricha* і зооглею порівняно з мулом у аеротенках. Організми рухливі. Пластівці мулу великі, добре осідають. Вода над мулом прозора.

За глибокої регенерації переважають великі інфузорії, що вільно плавають. Збільшуються розміри *Vorticella* і *Opercularia*. Пластівці мулу розпадаються на більш дрібні частинки. Вода над мулом каламутна, частинки не осідають.

Біоплівка

На відміну від активного мулу біоценоз біоплівки має значно більшу різноманітність форм гідробіонтів. За постійного очищення води в біофільтрі змінюється біоценоз біоплівки і спостерігається зміна зон сапробності.

У верхньому горизонті біофільтра створюються умови для полісапробної або альфа-мезосапробної зон. У біоплівці переважають гриби, різні бактерії, особливо багато нитчастих. Із найпростіших переважають безбарвні джгутикові (роди *Oicomonas* і *Bodo*) й інфузорії, що вільно плавають, загони рівновійкових, особливо *Paramecium*, із коловійкових інфузорій тільки *Opercularia*. У біофільтрі іноді спостерігаються представники зелених водоростей і джгутикових: *Selensastrum* і *Peranema*. Із черв'яків у незначній кількості зустрічаються коловертки і круглі.

Під час проходження рідини через біофільтр у біоплівці зменшується кількість бактерій, грибів і безбарвних джгутикових.

Збільшується кількість великих черевовійчастих інфузорій, що вільно плавають, з'являються різноманітні прикріплені інфузорії, збільшується кількість коловерток і круглих хробаків. У біоплівці переважають форми, властиві мезосапробній зоні.

6.2 Експериментальна частина

Відбір проб для мікроскопування:

1. Активний мул.

З аеротенків відбирається мулова рідина в пробірку в кількості 7–10 мл. Мул відстоюванням відділяється від рідини (2-3 хвилини) і потім піпеткою із широким отвором відбирається для мікроскопування;

2. Біоплівка.

Із різних горизонтів біофільтра відбирається засипний матеріал (шлак, щебінь, керамзит тощо), поміщається в порцелянову чашку і заливається невеликою кількістю дистильованої води. Із засипного матеріалу плівку необхідно зчищати препарувальними голками. Для мікроскопіювання біоплівку відбирають піпеткою з широким отвором.

Послідовність опису активного мулу і біоплівки

1. Швидкість осідання мулу (швидко, повільно).
2. Колір мулу (бурий, чорний, білуватий тощо).
3. Вода над мулом (прозора, каламутна, пофарбована).

Подальший опис ведуть при мікроскопуванні. Необхідно переглянути не менше 10 полів зору.

4. Щільність і розмір пластівців (щільні, подрібнені, великі, дрібні).
5. Присутність сторонніх краплень.
6. Склад гідробіонтів. Кількість гідробіонтів за п'ятибальною системою (див. нижче).
7. Наявність грибів і нитчастих бактерій.
8. Наявність бактерій, що вільно плавають (багато, мало).

Форми бактерій, які переважають (дрібні палички, великі палички, спірили тощо).

Пункти 4–7 описуються за малого збільшення (об'єktiv 8 x 10), а 8 і 9 – при великому збільшенні (об'єktiv x 40).

Кількість організмів оцінюється за п'ятибальною системою хрестиками: 1 – одиничне знаходження, 2 – мало, 3 – порядно, 4 – багато, 5 – масовий розвиток. Відзначається також стан організмів, їх рухливість.

Завдання

1. Мікроскопувати і дати опис зразків активного мулу та біоплівки (за схемою).
2. Назвати переважаючі форми гідробіонтів. Дати кількісну оцінку розвитку гідробіонтів за п'ятибальною системою.
3. Зробити висновок про стан активного мулу та біоплівки.

Контрольні питання

1. Назвіть особливості екосистеми активного мулу.
2. Яким чином здійснюється відбір проб активного мулу та біоплівки?
3. Який об'єм води відбирається для аналізу складу активного мулу?
4. У чому полягає загальна характеристика активного мулу?
5. Які показники оцінюються під час аналізу фізіологічного стану організмів активного мулу й біоплівки?
6. Опишіть види кількісного обліку організмів активного мулу та біоплівки.
7. Як оцінюється технологічний процес очищення води за станом активного мулу та біоплівки?

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кульский Л. А. Химия и микробиология воды : практикум / Л. А. Кульский, Т. М. Левченко, М. В. Петрова. – Київ : Вища школа, 1987. – 172 с.
2. Никитин Г. А. Биохимические основы микробиологических производств / Г. А. Никитин. – Київ : Вища школа, 1994. – 268 с.
3. Ротмистров М. Н. Микробиология очистки воды / М. Н. Ротмистров, П. Н. Гвоздяк, С. С. Ставская. – Київ : Наукова думка, 1978. – 268 с.
4. Нетрусов А. И. Микробиология : учеб. пособие / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М. : Издательский центр «Академия», 2006. – 352 с.
5. Мудрецова-Висс К. А. Микробиология, санитария и гигиена: учеб. для вузов. – 7-е изд., перераб. и доп. / К. А. Мудрецова-Висс, А. А. Кудряшова, В. П. Дедюхина. – М. : Деловая литература, 2001. – 388 с.
6. Віннікова О. І. Практикум з мікробіології: методичні рекомендації. – 2-ге вид, переробл. і допов. / О. І. Віннікова, І. М. Моргуль. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2009. – 33 с.
7. Лысак В. В. Микробиология: учеб. пособие для студентов биологических специальностей. / В. В. Лысак. – Минск : БГУ, 2005. – 263 с.
8. Загальна гігієна: пропедевтика гігієни: підручник / за ред. Є. Г. Гончарука. – Київ : Вища шк., 1995. – 552 с.
9. Гончарук В. В. Наука о воде. / В. В. Гончарук. – Київ : Наукова думка, 2010. – 512 с.
10. Билетова Н. В. Санитарная микробиология / Н. В. Билетова, Р. П. Корнелаева, Л. Г. Кострикина, за ред. С. Я. Любашенко. – М. : Пищ. пр-сть, 1980. – 352 с.
11. ДСанПіН 2.2.4-171-10. Державні санітарні правила і норми. Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною : ДСанПіН 2.2.4-171-10. – Київ, 2010. – 160 с.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Фотографії основних видів інфузорій

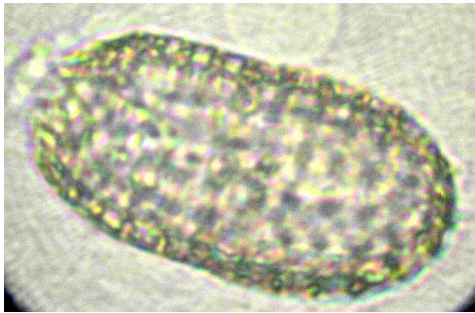


Рисунок А.1 – Колепс гіртус



Рисунок А.2 – Ділептус ансер

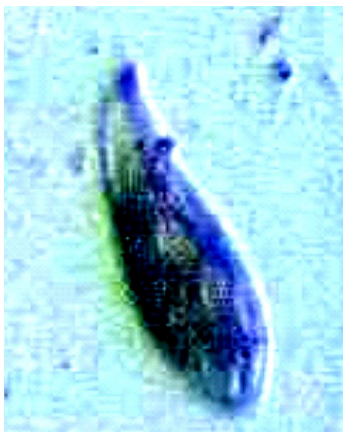


Рисунок А.3 – Спатідіум поркулюс

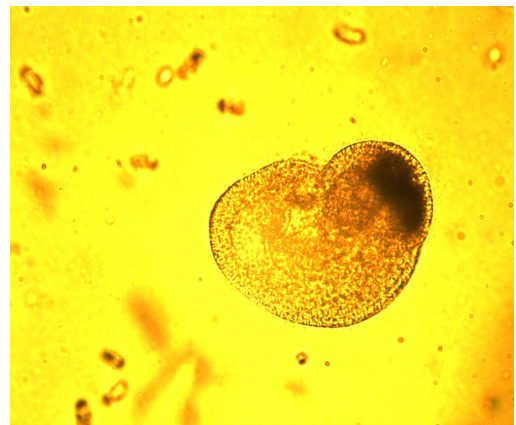


Рисунок А.4 – Кольпода кукулюс



Рисунок А.5 – Кольпода мапазі

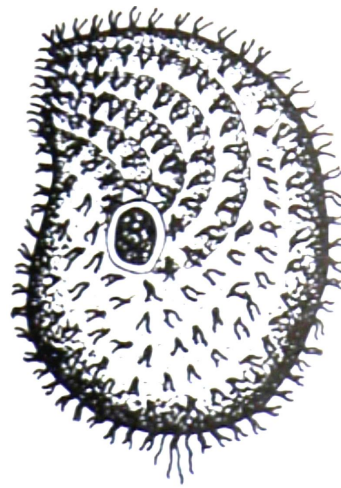


Рисунок А.6 – Кольпода штейні

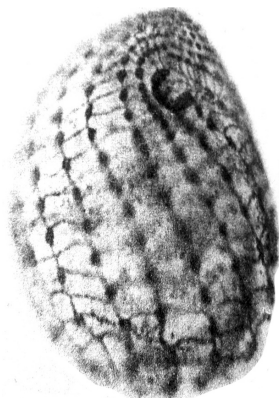


Рисунок А.7 – Кольпода аспера



Рисунок А.8 – Інфузорія-туфелька

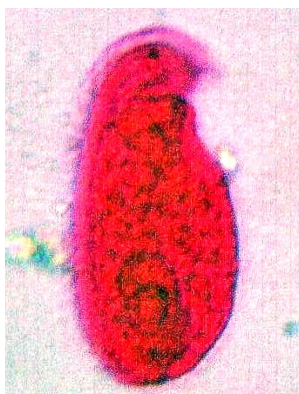


Рисунок А.9 – Кольпідіум кольпода



Рисунок А.10 – Уронема маріnum

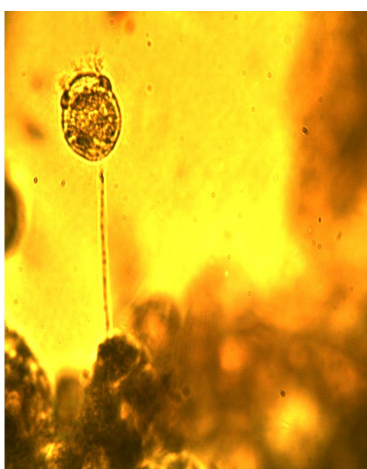


Рисунок А.11 – Вортіцелла конвалєрія
Сувоїка



Рисунок А.12 – Стромбідіум



Рисунок А.13 – Уролептус пісціс

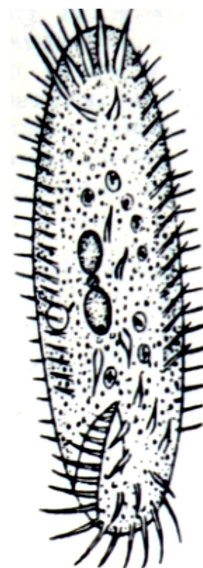


Рисунок А.14 – Оксітріха релліонелла



Рисунок А.15 – Стілоніхія мітілюс



Рисунок А.16 – Аспідіска костата

ДОДАТОК Б

Тести для ідентифікації патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів

Стафілококи. Морфологічно *Staphylococcus* – коки, розташовані у вигляді характерних «виноградних грон». Патогенні стафілококи на кров'яному агарі утворюють колонії діаметром 2-3 мм, оточені прозорою зоною гемолізу; на молочному або жовчно-сольовому агарі – колонії, оточені зоною просвітління (протеолітична активність) і райдужним віночком (наявність ферменту лецитовітеллази).

Із підозрілих колоній роблять висів на м'ясопептонний агар для виділення чистої культури. Після 24 год інкубації за температури 37 °С перевіряється плазмокоагулювальна активність культури посівом у пробірки з 0,5 мл цитратної плазми (людської або кролячої) в розведенні 1 : 4. Патогенні стафілококи коагулюють плазму протягом 2–24 год в умовах термостата. Облік проводять через 1, 2, 4 і потім 24 год за утворенням невеликого желеподібного згустку на дні пробірки. Виділені стафілококи піддаються фаготипуванню за необхідності встановлення джерела виникнення стафілококової інфекції та шляхів поширення.

Стрептококи. Один із представників – *Str. viridans* (зеленілий стрептокок) – постійний непатогенний мешканець посіву. На кров'яному агарі *Streptococcus* утворюють дрібні (точкові) сіруваті колонії з прозорою зоною гемолізу (β -гемолітичні) і колонії із зеленувато-бурим ореолом і підвищеною прозорістю середовища (α -зеленілий). На кров'яному агарі нерідко зростання стрептококів пригнічується швидкозростаючою іншою мікрофлорою повітря. Тому облік краще вести на чашках із селективними середовищами – Гарро і Туржецького, в які для придушення супутньої флори додається генціан фіолетовий, що має бактеріостатичні властивості відносно сапрофітов повітря. Культивування проводять за 37 °С. Після підрахунку колоній, що вирости з підозрілих на стрептококи, роблять мазки (стрептококи розташовуються короткими ланцюжками або скупченнями) і потім пересівають на кров'яний агар або в цукровий бульйон. У бульйоні стрептококи утворюють ланцюжки, в чому необхідно переконатися за допомогою мікроскопування мазків, приготовлених з характерного придонного осаду (у вигляді пластівців або крихт на дні пробірки при прозорому бульйоні).

Дослідним шляхом встановлено така залежність: якщо в 2-х чашках після експозиції в 20 хв розвинулося 2 колонії, то повітря вважають чистим, якщо 3-4 – слабо забрудненим. У класах після занять дослідниками вловлювалося до 50000 клітин зеленілого стрептокока в 1м³.

Таблиця Б.1 – Біохімічні властивості грамнегативних бактерій [4]

Рід бактерій	БГКП				<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Salmonella</i>
Найменування тесту	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia</i>			
1. Забарвлення за Грамом (24 год)	–	–	–	–	–	–	–
2. Оксидаза (24 год)	–	–	–	–	–	–	–
3. Утворення індолу	+	+	–	+	[–]	+ тільки <i>vulgaris</i> , –	–
4. Р. Фогеса – Проскауера	–	+	+	–	–	–	–
5. Цитрат (середовище Сіммонса)	[+]	+	+	–	–	(+)	+
6. Утворення сірководню	–	–	–	–	–	+	+
7. Рухливість	+	–	+	+	–	+	+
8. Гідроліз желатину (22 °C)	–	–	–	–	–	+	–
9. Утворення кислоти з <i>D</i> -глюкози	+	+	+	+	+	+	+
10. Утворення газу з <i>D</i> -глюкози	+	+	+	+	–	+	+
11. Утворення кислоти з лактози	(+)	+	+	+	–	–	+
12. Каталаза (24 год)	+	+	+	+	+	+	+
13. Окиснення-бродиння	бродиння	бродиння	бродиння	бродиння	бродиння	бродиння	бродиння

Примітка: +, – – позитивний (негативний) тест спостерігається в 90–100 % штамів; [+], [–] – 76–89 % штамів; (+), (–) – 25–75 % штамів.

Escherichia coli. Колонії із середовища Ендо пересівають у лактозний бульйон з борною кислотою або в жовчно-лактозне середовище з діамантовим зеленим, попередньо нагріті до температури 43–44 °C (на водяній бані), і відразу після засіву теплі пробірки поміщають у термостат за

температури 43 °С на 24 год. Борна кислота і діамантовий зелений, що додаються в середовища, є інгібіторами супутньої флори. Поява газоутворення свідчить про присутність *E. coli* в досліджуваній воді. Якщо немає можливості зробити посів у лактозний бульйон із борною кислотою, то ідентифікацію *E. coli* проводять за двома ознаками: *ферментація лактози за температури 44,5 °С протягом 24 год і здатності утворювати індол*. У цьому випадку підозрілі на *E. coli* колонії засівають паралельно в 2 пробірки: одну з напівпроникним середовищем із лактозою, другу – із середовищем для визначення індолу (бульйон Хоттингера, пептонна вода або інше середовище, що містить триптофан), під пробку пробірки вставляють індикаторний папірець на індол і інкубують за температури 44,5 °С. Посівом у пробірки з середовищем ФКП-1 ідентифікація спрощується, оскільки в цьому середовищі містяться лактоза і триптофан. Позитивна відповідь дається в разі утворення газу (розкладання лактози) та індолу (ферментація триптофану).

Тест Грегерсена. Цим тестом можна замінити забарвлення за Грамом. У краплі 3 %-го водного розчину КОН на предметному склі емульгують бактерійних масу, взятую з щільною середовища. Через кілька секунд після перемішування за петлею тягнуться слизові нитки, що вказує на приналежність досліджуваної колонії до грамнегативних. Грам (+) бактерії слизові нитки не утворюють.

Каталазний тест. Наносять 1-2 краплі 3 % перекису водню безпосередньо на досліджувану колонію. Поява бульбашок свідчить про виділення бактеріями каталази.

Оксидазний тест проводять із колоніями мікроорганізмів, що вирости на середовищі Ендо. Частину підозрілих колоній стерильною петлею переносять на фільтрувальний папір, просочений реактивом: диметил-пенілендіаміном і α -нафтолом. Якщо мікроорганізми, які вирости на фільтрі, виділяють оксидазу, колір колонії через 2–5 хв змінюється на синьо-фіолетовий. Такі колонії не враховують під час аналізу води. Можна на фільтрувальний папір з індикатором накладати весь фільтр із колоніями, які вирости на ньому. Колонії БГКП темно-червоного кольору, не змінюють свого забарвлення (оскільки кишкові палички оксидазонегативні) і враховуються як представники фекального забруднення води.

У сумнівних випадках – за наявності колоній рожевих або безбарвних (лактозоотріцательних), що не мають оксидазної активності, додатково визначають здатність бактерій ферментувати глюкозу за температури 37 °С і проявляти протеолітичну активність на середовищі Ендо з молоком. Колонії враховують як БГКП, якщо вони утворені грамнегативними паличками, ферментують глюкозу до кислоти і газу і не мають протеолітичної активності.

ДОДАТОК В

Таблиця В.1 – Санітарно-мікробіологічні показники для води [5]

Категорія води	Показники		
	Мікробне число	Колі-титр	Колі-індекс
Питна вода водопровідна	не більше 100	не менше 300	не більше 3
Вода фасована	не більше 20	не менше 300	не більше 3
Вода питна з колодязів і каптажів джерел	—	не менше 100	не більше 10

Виробничо-практичне видання

Методичні рекомендації
для виконання лабораторних робіт
із навчальної дисципліни

«МІКРОБІОЛОГІЯ»

*(для студентів 4 курсу денної і заочної форм навчання
підготовки 6.060101 – Будівництво, професійне спрямування
«Водопостачання та водовідведення»*

Укладач **ЧУБ** Ірина Миколаївна

Відповідальний за випуск *К. Б. Сорокіна*

За авторською редакцією

Комп'ютерне верстання *І. М. Чуб*

План 2015, поз. 115 М

Підп. до друку 07.06.2016. Формат 60 x 84 1/16.
Друк. на ризографі. Ум. друк. арк. 5, 9.
Тираж 50 пр. Зам. № .

Видавець і виготовлювач:
Харківський національний університет
міського господарства імені О. М. Бекетова,
вул. Маршала Бажанова, 17, Харків, 61002.
Електронна адреса: rectorat@kname.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:
ДК № 5328 від 11.04.2017.